

Invasiv aspergillose

*En oversikt over muggsoppfunn
i autopsier ved
Oslo Universitetssykehus,
Rikshospitalet*

Tarmo Tavas



Prosjektoppgave ved Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høsten 2012

© Tarmo Tavas

2012

Invasiv aspergillose.

En oversikt over muggsoppfunn i autopsier ved Oslo universitetssykehus,
Rikshospitalet.

Veileder: professor dr.med. Peter Gaustad, Avdeling for Mikrobiologi, OUS-RH

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Abstract

OBJECTIVE This study was conducted as a part of an ongoing fungal study project at the Microbiological Department at Oslo University Hospital, Rikshospitalet. The aim was to answer two questions: 1 What is the current knowledge of invasive aspergillosis (IA)? 2 How can we interpret the findings of mold in autopsy material?

BACKGROUND Invasive fungal infections are an increasing challenge. More than 80 % of the invasive mycoses are caused by either *Aspergillus* or *Candida spp.* Patients susceptible to IA usually suffer from bone marrow failure or are otherwise severely immunocompromised due to their underlying disease or treatment, e.g. patients with hematologic malignancies, congenital or acquired immunodeficiency, transplant recipients, patients with malignant tumors and those with severe autoimmune disorders. There are approximately 20 different species of *Aspergillus* pathogenic to humans, *fumigatus* being the most important. Early diagnosis is crucial for successful treatment. Diagnostic gold standard is direct detection by cultivation, staining and microscopy, but often clinicians must rely on indirect methods such as radiology or detection of fungal enzymes, metabolites and DNA. Treatment of IA consists of a combination of antifungal therapy and reversal of the immunosuppression. There are several effective drugs among polyenes, azoles and echinocandins. For certain patient groups the prophylactic anti mold treatment is recommended.

METHOD In the first part of this paper the basic issues of invasive mold infections with emphasis on and illustrated by aspergillosis are discussed. The overview is based on a variety of research, reviews and textbook articles found by specific search through PubMed in the current databases Medline and the Cochrane Library, and by following relevant references listed in relevant scientific articles. In the second part, data from autopsies and clinical records at OUS-RH over a period of three years 2008-2011 is presented and discussed.

RESULTS There were 36 unique cases where the cultivation and/ or autopsy detected mold. The lists from the Pathological and Microbiological departments were not identical. 26 out of 36 (72%) of cases appeared to be contamination, leaving 10 out of 36 (28%) to be considered real infections. The incidence was steady – 2 to 4 per year. 7 out of 10 infections were located to lungs. The age of the patient population ranged from 24 to 67, with median of 58.5 years. 7 out of 10 were treated for hematologic malignancies. In 6 out of 10 cases the invasive mold infection was not suspected ante mortem. 7 out of 10 patients were treated with antifungals effective against mold. 3 out of 10 patients where the autopsy diagnosed invasive mold infection were neither suspected to have one or treated for such.

DISCUSSION The figures calculated here are not statistically significant due to limited sample size. The patient population is special and the diagnosis itself rare. An extensive under-reporting is suspected. The sample of ten cases in this study was congruent with the general knowledge about such infections. In all the cases there was an underlying impairment of the immune system, the majority had hematologic malignancy, most of them had pulmonary involvement. Most infections were due to *Aspergillus*, predominantly *fumigatus*.

Innholdsfortegnelse

1. Bakgrunn og mål	1
1. Innledning om invasive aspergilloser	2
1.1. Humanpatogene sopp	2
1.2. Humane mykoser	4
1.3. Den humane vert	5
1.4. Aspergillus	7
1.4.1. Virulensfaktorer	8
1.5. Patogenese ved aspergillose	10
1.5.1. Lungesyke	10
1.5.2. Makrofager – nedsatt fagocytose og utskillelse av betennelsesmediatorer	11
1.5.3. Nøytrofile granulocytter – kvantitative og kvalitative defekter	11
1.5.4. Genetisk variasjon	12
1.6. Kliniske manifestasjoner av aspergillose	13
1.6.1. ABPA	13
1.6.2. Aspergillom	14
1.6.3. Nekrotiserende aspergillose	14
1.6.4. Invasiv aspergillose	14
1.7. Diagnose av aspergillose	15
1.7.1. Direkte metoder	16
1.7.2. Indirekte metoder	19
1.7.3. Nukleinsyretester	24
1.7.4. Ulike prøvematerialer	27
1.7.5. Radiologi	28
1.7.6. Integrert bruk av metoder	31
1.8. Behandling av aspergillose	33
1.8.1. Antimykotika	33
1.8.2. Adjuvant terapi	35
1.8.3. Kirurgi	36
1.8.4. Profylakse og forebyggende tiltak	36
1.8.5. Evidensbaserte behandlingsanbefalinger	37
2. Materiale og metode	40
3. Resultater	42
3.1. Forurensning	44
3.2. Infeksjoner	45
3.2.1. Tidsmessig fordeling	45
3.2.2. Artsbestemmelse	46
3.2.3. Lokalisasjon	47
3.2.4. Underliggende tilstand	47
3.2.5. Mistenkt soppinfeksjon og behandling	48
Diskusjon	49
3.3. Forekomst	49
3.4. Forurensning	51
3.5. Pasientene med invasiv aspergillose	52
3.6. Diagnostisering	53
Referanser	54

1. Bakgrunn og mål

Soppinfeksjoner er et økende problem pga stadig flere immunsvekkede pasienter. Den etiologiske diagnosen er ofte mangelfull. I den forbindelse har patologene og mikrobiologene ved Rikshospitalet siden 2000 samarbeidet om å undersøke autopsipasientene for mulig soppinfeksjon. Denne oppgaven ble til i forbindelse med et slikt sopp-prosjekt ved Mikrobiologisk avdeling ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet.

Når jeg ble engasjert i å gå gjennom slike soppfunn, måtte jeg erkjenne mine sparsommelige forkunnskaper, avgrense søkefeltet og definere (lærings)mål. Etter en kort drøfting med oppdragsgiver ble vi enige om å konsentrere oss om muggsopp, og jeg definerte følgende mål for oppgaven:

1 Hva er dagens kunnskap om invasive muggsoppinfeksjoner?

- Hva slags organisme er muggsopp?
- Hvordan kan muggsopp skade mennesket?
- Hvorfor blir noen rammet av invasive muggsoppinfeksjoner?
- Hvordan kan vi oppdage og behandle slike infeksjoner?

2 Hva representerer og hvordan kan vi tolke muggsoppfunnene i autopsimateriale?

- Hvor ofte finner vi muggsopp i autopsier?
- Representerer funnene reelle invasive muggsoppinfeksjoner?
- Hva slags pasienter døde med eller av slike infeksjoner ved RH?
- Ble disse infeksjonene oppdaget og forsøkt behandlet før døden?

Svarene på målene presenteres i oppgavens to deler – først kommer en innledende litteraturbasert oversikt over temaet og deretter en praktisk gjennomgang av obduksjonsfunn samt diskusjon av funnene.

Den første delen er ment å kunne gi en oppdatert forståelse av patogenese, klinikk og muligheter for diagnostisering og behandling av invasiv aspergillose. Denne forståelse skal også danne bakteppe, ramme for tolkning av funnene i den praktiske delen av oppgaven. I den andre delen av oppgaven skal jeg gi oversikt over mine funn. Jeg skal også prøve å drøfte funnene i lys av målene for oppgaven, samt diskutere enkelte aspekter ved dem.

1. Innledning om invasive aspergilloser

1.1. *Humanpatogene sopp*

Alle levende organismer kan deles inn i fem kongeriker. Sopp (fungi) er eukaryote mikroorganismer (diameter på 3-50 μm) som mangler klorofyll og dermed trenger organiske næringsstoffer for vekst og formering. Soppene kan vokse som individuelle enkeltceller - gjærsopp, eller som sammenhengende rekker av tubulære celler med eller uten skillevegger (septa) og forgreninger – muggsopp. Enkelte sopp vokser som gjærsopp ved kroppstemperatur og som muggsopp ved lavere temperaturer. Disse kalles dimorfe pga denne egenskapen. De fleste soppene forefinnes i vegetativ fase i filamentøs form der disse tubulære sammenhengende celler med cellekjerner, mitokondrier, ribosomer og Golgi-apparat, endoplasmatisk retikulum, støttet av intracellulære mikrotubuli og kitinholdige ytre vegger kan danne lange, tynne, forgrenede mikroskopiske tråder som kalles hyfer. Hyfene vokser ved longitudinell ekstensjon og forgreninger, og kan danne omfattende nettverk kalt mycelium. Mycelier kan av og til oppnå imponerende størrelser med betydelig biomasse og være synlig for det blotte øye. Under visse forhold kan soppene lage sporer, også kalt konidier – mikroskopiske, lette, luft- og vannborne ikkevegetative soppceller med sparsommelig mengder av cytoplasma og organeller, som har en ekstrem motstandskraft mot ytre påvirkning, som for eksempel rensing av vann og luft vha filtre, UV-lys, tilsetning av klor og lignende.

Sopp er heterotrofe organismer – de krever organisk næring. På bakgrunn av hvordan de skaffer føde, kan vi dele soppene inn i to kategorier: saprofytter, som lever på dødt materiale (hos mennesker hud- og neglsopp som lever av dødt, avstøtt vev), og parasitter, som lever av og konkurrerer med andre levende organismer om næringsstoffer (hos mennesker alle dype og invasive soppinfeksjoner).

Siden sopp først ble betraktet å være en plante, ble den tradisjonelle klassifiseringen av sopp bestemt av International Code of Botanical Nomenclature på basis av deres utseende og evnen til seksuell formering. I senere tid har man kunnet bruke sekvenseringen av DNA, spesielt det godt bevarte ribosomale DNA, til å kartlegge fylogenesen til soppartene. Men også andre oppdagelser, som f.eks tidligere ukjent seksuell formering hos *Aspergillus fumigatus* (1), er med på å påvirke soppartenes taksonomi.

Tabell 1.1 **Fylogenesen til humanpatogene sopp**

Divisjon	Subdivisjon	Klasse	Orden	Familie	Slekt
Ascomycota	Pezizomycotina	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus
					Penicillium
					Exophila
			Onygenales	Onygenaceae	Coccidioides
					Histoplasma
		Sordariomycetes	Microascales	Ajellomycetaceae	Paracoccidioides
				Microascaceae	Pseudallescheria
					Scedosporium
			Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium
	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida
		Pneumocystidomycetes	Pneumocystidales	Pneumocystidaceae	Pneumocystis
		Euscomycetes	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	Sporothrix
		Ascomycetes			Blastomyces
Zygomycota		Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	Rhizopus
					Absidia
					Mucor
			Entomophthorales	Basidiobolaceae	Basidiobolus
Basidiomycota	Entomophthoromycotina			Ancylistaceae	Coniobolus
	Ustilaginomycotina	Exobasidiomycetes	Malasseziales	Malasseziaceae	Cryptococcus
					Trichosporon
					Malassezia

Den fylogenetiske inndelingen av humanpatogene sopp (Tabell 1.1) kan være interessant med tanke på den genetiske tilhørigheten og variasjonen samt naturlig forekommende resistens og muligheten for eventuell spredning av gener for resistens. I den kliniske hverdagen brukes dog en annen inndeling av humanpatogene sopp. Denne inndelingen (Tabell 1.2) tar utgangspunkt i morfologien – vekstmønsteret i renkultur ved normal værelsestemperatur (20-25 °C) og ved kroppstemperatur (37 °C). Dette er noe man kan observere direkte på inkuberte vekstmedier, utstryk, våtpreparater og fiksert materiale.

Tabell 1.2 **Morfologiske trekk hos vanlige humanpatogene sopp (oversatt fra (2))**

	Slekt	Vanlige morfologiske trekk i humant vev
Gjærsopp	Candida	Knoppskytende gjærsoppseller, pseudohyfer, hyfer
	Cryptococcus	Innkapslede knoppskytende gjærsoppceller
	Exophila/ Wangiella	Svart gjærsopp, pseudohyfer
	Trichosporon	Pleomorft utseende, pseudohyfer
Muggsopp	Aspergillus, Fysarium, Pseudallescheria, Scedosporium	Smale hyfer, forgrening på 45°
	Rhizopus og andre zygomycetes	Brede hyfer, ingen septa, forgrening på 90°
Dimorfe sopp	Blastomyces	Gjærsopp med bredbaserte knopper
	Coccidioides	Store sphaerulae med endosporer
	Histoplasma	Liten knoppskytende gjærsopp
	Paracoccidioides	Gjærsopp med flere knopper per celle
	Penicillium	Intracellulær gjærsopp
	Sporothrix	Avlange knoppskytende gjærsoppceller
Andre	Pneumocystis	Vekstceller og cyster med opptil 8 indre sporer

Kongeriket sopp er svært utbredt og tallrikt, og samler en variert gruppe organismer. Det finnes i alt omtrent 300 000 ulike sopparter, hvorav ca 200-600 har evnen til å vokse hos mennesker og eventuelt forårsake sykdom – mykoser. Over 99% av disse kan tilskrives kun 20 arter. (3) Ved alvorlige, invasive og systemiske mykoser tilhører over 80 % av agens slektene *Aspergillus* eller *Candida* i nesten jevnstore andeler, men med ulik forekomst av fungemi og assosiert mortalitet. (4) Både den generelle forekomsten av invasive soppinfeksjoner, artsvariasjonen og infeksjonenes predileksjonssteder viser betydelig og karakteristisk variasjon hos ulike populasjoner av pasienter. Med tanke på vurdering av funn i prøver hentet fra kroppens både sterile og ikke-sterile hulrom samt fra ulike vev hos pasientgrupper med varierende underliggende tilstander og immunstatus, kan det være nyttig å skille mellom en eventuell forurensning av prøven, sporadisk forekommende, koloniserende, opportunistiske og patogene sopparter hos mennesker. En enkel oversikt over patogenisitetsevne til de vanligste humanpatogene sopp er gjengitt i Tabell 1.3.

Tabell 1.3 Patogenisitetsevne hos humane sopp (oversatt fra (2))

Obligate patogener	<i>Blastomyces</i> <i>Coccidioides</i> <i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Sporothrix</i>
Opportunister	<i>Aspergillus</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Exophiala</i> / <i>Wangiella</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Pneumocystis</i> <i>Pseudallescheria</i> <i>Scedosporium</i> <i>Rhizopus</i> <i>Zygomycetes</i>

1.2. Humane mykoser

Kolonisering av og infeksjoner hos mennesker med humanpatogene sopp kan ha svært varierende uttryksformer og alvorlighetsgrad. Mens noen sopparter har en nokså begrenset geografisk utbredelse, er andre ekte kosmopolitter. (5) Sopp kan påvises leilighetsvis eller være en del av normalflora hos den enkelte. De fleste humanpatogene sopp er ikke restriktivt avhengig av menneskelig vert. Mennesket er ofte kun en tilfeldig vert, og soppen er ellers vidt utbredt i nærmiljøets flora og fauna. Således kan infeksjon med hyfer og konidier skje ved overfladisk kontakt, inhalasjon, svelging, inokulasjon eller kontaminering av sår. Avhengig av lokalisasjon, utbredelse og klinikk er det vanlig å dele humane mykoser i to kategorier – overfladiske (begrenset til hud og slimhinner) og invasive (soppceller tilstede i normalt sterile kroppsrom). Invasive mykoser kan også spre seg videre fra sitt primære fokus - de kan bli disseminerte, systemiske.

Overfladiske mykoser

Disse mykosene dreier seg om infeksjoner og kolonisering med sopp i de ytterste lagene av hud og slimhinner. De helt overfladiske holder seg til de ytterste, keratiniserte, døde lagene av epidermis. Sopparter er her ofte saprofyttære og forårsaker minimale plager, eventuelt i form av en blandning av allergisk, irritativ og diffus inflammatorisk reaksjon.

Noen av soppartene kan også ta seg videre inn blant de mer basale lagene av epidermis. Selv om man kan diskutere om soppen egentlig invaderer epidermis, kan resultatet bli omfattende hudlesjoner, kanskje først og fremst pga den nokså kraftige inflammasjonsreaksjonen soppen kan fremkalle der. Soppartene her er ofte filamentøse saprofytter, men også candidoser forekommer. Derimot når det gjelder hele lengden av GI-trakten – helt fra den orale slimhinnen, i svelg og i spiserør og frem til endetarmen og analåpningen – er *Candida albicans* nesten enerådende i å kunne kolonisere slimhinnen og forårsake et kontinuum fra ingen symptomer til kraftige inflammasjoner med blødende erosjoner.

Ved traumatiske lesjoner kan enkelte sopper fra miljøet også inokuleres rett i subkutant vev. En sjelden gang kan en slik forurensning av sår gi opphav til lokale avgrensede, men ikke sjelden kroniske mykoser.

Invasive mykoser

Dersom soppen klarer å feste seg i epitellaget, germinere og unngå å bli eliminert av makrofager og tilkommende granulocytter, vil noen av hyfene kunne ta seg videre innover i organismen. Ved hjelp av proteasene og glykoproteinene til festing kan soppen spalte sin vei gjennom basallamina og ekstracellulærmatriks. Ved invasjon inn i kapillærene og lymfeårene, kan hyfer spaltes av og fraktes videre gjennom årene. Da har mykosen gått over fra å være lokalinvasiv til å bli disseminert. Hyfene kan i prinsippet stoppe opp hvor som helst i kroppen, ta seg gjennom åreveggen på nytt, ekstravasere, og danne nye satellittkolonier. Slike disseminerte kolonier kommer til uttrykk som lokale inflammasjoner, ofte med sentral nekrose – dvs abscesser. Slike abscesser dannes gjerne i det retikuloendoteliale systemet og andre rikt vaskulariserte organer - lymfeknuter, benmarg, milt, lever, lunger og nyrer, hjertet og sentralnervesystemet.

1.3. Den humane vert

I sitt daglige liv blir mennesket kontinuerlig eksponert for hyfer og sporer fra myriader av sopp. Grunnen til at noen av disse lykkes med å slå rot og penetrere hud, luftveiseepitel og slimhinner i GI-tractus, ligger i en kombinasjon av soppenes virulensfaktorer og vertens motstandskraft.

Den første linjen i vertens forsvar er den ytre, fysiske barrieren – inntakt hud, slimhinner i luftveiene og i GI-tractus. Svikt av barrieren kan komme av fysiske skader – traumatiske eller iatrogene i forbindelse med kirurgiske inngrep eller innlagte fremmedlegemer som katetere, porter ol. Disse kan også gi grobunn til kolonisering i form av biofilm som kan danne fokus for stadig emisjon av sopp til fungemi. Slimhinner kan også bli svekket og skadet av underliggende grunnsykdom og pågående behandling med f.eks stråling og cytostatika. Inn under den velfungerende mukosa kan man også regne fungerende cilier og tilstrekkelig lag av mukus med sekretoriske peptider som IgA, defensiner, surfaktanter SP-A, SP-D, ulike kitinaser, histatiner og laktoferrin, lav

glukosekonsentrasjon, normal pH og hormonnivå, samt den fungerende, balanserte og gunstige bakteriofloraen som vil kunne utkonkurrere koloniserende sopp. (2, 6, 7) Listen over sekretoriske peptider fra pneumocytter, begerceller, makrofager og neutrofile leukocytter er ikke endelig, men utvides fortløpende mens den intense forskningen stadig oppdager nye kjemiske molekyler med antimikrobielle egenskaper.

Den andre linjen i forsvaret utgjør den medfødte delen av immunsystemet. Denne består av både cellulære og humorale komponenter. Langs hele luftveis- og fordøyelsestraktens epitel er det et nettverk av stasjonære makrofager og dendritiske celler. I tillegg inneholder ekstracellulærvæsken, lymfen og blodplasma en rekke immunologisk aktive proteiner. Alle dyr har under evolusjonen kontinuerlig blitt eksponert for sopp. Hos mennesket har det blitt utviklet reseptorer for enkelte velbevarte felles overflateepitoper hos grupper av patogener, deriblant sopper. Slike epitoper har fått navnet *Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMP. Blant kjente motiver i soppens cellevegg er β -glucaner og mannan. PAMP kjennes igjen og bindes av reseptorer som kalles *Pathogen Recognition Receptors* – PRR. Slike reseptorer finnes både i løselig form som opsoniner (f.eks mannosebindende lektin MBL og komplementfaktorer) og cellemembranbunden form. Den sistnevnte form kan tjene såvel til adhesjon og fagocytose (f.eks MBL og dectin-1) som til aktivering av intracellulære signalveier (f.eks toll like-reseptors TLR2 og TLR4) som kan føre til aktivering av celler og produksjon av inflammatoriske cytokiner.

Risikopopulasjon for invasive soppsykdommer

Med kunnskap om soppens spredningsveier og vertsorganismens organisering av forsvar kan man dedusere seg frem til pasientgrupper som har defekter i ulike deler av det komplette, kompetente immunforsvaret – alt fra skadet mukosa og epitel, dysfunksjonelle granulocytter og fagocytter, manglende evne til produksjon av proinflammatoriske cytokiner og aktivering av immunsystemet til forstyrret hormonbalanse, svekket almentilstand, samt pasienter med fysiske nisjer som fremmedlegemer og dårlig sirkulert vev eller anatomisk unormale kaviteter. Generelt gjelder dette pasienter som av sin underliggende sykdom eller behandling blir immunosupprimerte, eller opplever benmargssvikt, eller blir utsatt for cytostatika og stråling, eller av annen grunn får økt fritt tilgjengelig glukose og jern i blod og sekreter, samt nedsatt pH. I klinisk praksis dreier det seg om store pasientgrupper med hematologisk malignitet, medfødt eller ervervet immunsvikt (f.eks CGD og HIV), samt transplanterte, pasienter med maligne tumorer og dem med alvorlige autoimmune lidelser under behandling. Men også blant pasienter på intensivavdelinger, samt pasienter med mindre alvorlige men kroniske lidelser, så som diabetes, KOLS, alkoholisme og leversvikt, har det blitt registrert økende insidens av invasive mykoser.(8)

Hos den immunkompromitterte verten vil soppartene, som har forskjellige immunogene egenskaper, ha ulike fortrinn ved kolonisering, infeksjon og invasjon (se også Tabell 1.4). Slik vil man kunne diagnostisk og behandlingsmessig dra nytte av empirien.

Tabell 1.4 Disponerende vertsfaktorer og humanpatogene sopp (oversatt fra (2))

Skadet hud eller mukosa	Candida Malassezia Rhizopus og andre Zygomycetes
Kvalitativ eller kvantitativ nøytropeni	Aspergillus Candida Rhizopus og andre Zygomycetes
Cellulær immunsvikt	Candida Cryptococcus Histoplasma Coccidioides Penicillium Pneumocystis
Diabetes Acidose Jernoverskudd	Rhizopus og andre Zygomycetes

1.4. Aspergillus

Aspergillus spp er muggsopp som hører til familien Trichocomaceae i ordenen Eurotiales i klassen Eurotiomycetes i divisjonen Ascomycota i kongeriket Fungi. Slekten *Aspergillus* inneholder rundt 200 hittil identifiserte arter som finnes rikelig over hele kloden. Selv om de spres lett i ulike media ved hjelp av sine lette amfifile konidier og overlever store variasjoner i miljøet, er de i utgangspunktet saprofyttære muggsopp som lever i overflatejorda av hovedsakelig råtnende vegetasjon. *Aspergillus spp* innehar et vidt spekter av enzymer. Mange av *Aspergillus* enzymene tjener til å metabolisere død vegetasjon, men noen av disse har også interesse for mennesket og utnyttes industrielt. *A. niger* brukes til produksjon av sitronsyre, amylaser, phytaser og proteaser, *A. terreus* brukes til produksjon av kolesterolsenkende Lovastatin, *A. oryzae* brukes til fermentering av soyabønner til soyasaus og ris til sake. (9) Men flere av *A. spp* er også i stand til å skape problemer for mennesket ved å ødelegge matkildene. F.eks kan *A. flavus* og *parasiticus* kolonisere og forurense avlinger med den svært karsinogene giften aflatoksin. (10)

Hos mennesket har rundt 20 *Aspergillus* arter blitt identifisert å kunne forårsake sykdom (9, 11), hvorav de viktigste er *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* og *A. nidulans*. Den store majoriteten av livstruende invasive aspergilloser kan tilskrives arten *fumigatus* alene. (3)

1.4.1. Virulensfaktorer

Aspergillus spp innehar en rekke virulensfaktorer i form av deres livsform som sporer, fysiske egenskaper som størrelse på sporer, overflatemolekyler som hydrofobiner og glykoproteiner, som tjener til kamuflasje og adhesjon, gener som koder for enzymer som kan skade verten og skaffe næring til soppen, samt et antall primære og sekundære metabolitter som gjennom sin påvirkning av vertsceller og det immunologiske apparatet gir soppen gode betingelser for germinering, vekst og invasjon av vertsorganismen.

Strukturelle egenskaper

Sporer

Den første og kanskje viktigste egenskapen hos *Aspergillus* som gjør at de kan overleve og spre seg i nær sagt hele atmosfæren, er evnen til å danne sporer. Sporene, i motsetning til de vegetative hyfene, er lette og små. De spres lett med luftens bevegelse og inhaleres lett. Det har blitt estimert at med de 10 000-15 000 liter luft vi inhalerer daglig, når ca 200 *Aspergillus*konidier våre luftveier hver dag. (9) Og siden *Aspergillus*sporenes størrelse er på 2-3 μm , når de lett frem til de minste bronkiolene og alveolene.

Melaniner

Konidiene er også svært motstandskraftige mot ytre påvirkninger. I sin doktoravhandling påviste Adilia Warris (12) at *A. fumigatus*-sporene som ble påvist i Maridalsvannet (et overflatevann og kilden til drikkevannet i store deler av Oslo) klarte å nå pasientene på Rikshospitalet og forårsake sykdom. Dermed hadde sporene overlevd standardbehandlingen drikkevannet i Oslo gjennomgår – filtrering og klorinering. En av faktorene som gir soppsporene beskyttelse, har blitt påvist å være produksjon av melaniner – fargestoff som beskytter dem mot både UV-lys og reaktive oksygenmetabolitter - ROS. (13) De samme melaninene er også med på å maskere sporene ved å blokkere PRRer hos profesjonelle fagocytter. (14)

Overflatehydrofobiner

*Aspergillus*sporene har en helt spesiell overflate. De er dekket med stort antall av små rør eller staver som til sammen danner et heldekkende og beskyttende luftig rørlag, på engelsk kalt "rodlet layer". Dette laget gir sporene helt unike egenskaper.

Hovedbestanddelen i disse små stavene er noe som kalles overflatehydrofobiner. Dette molekylet - protein RodA - er på ca 100 aminosyrer, det er selvfølgelig og beholder strukturen opp til nær kokepunktet. De hovedsakelig hydrofile molekyler inneholder også i sine β -hairpin loops enkelte hydrofobe alifatiske sidekjerder og blir dermed, trass i navnet, egentlig amfifile. Denne egenskapen spiller en dobbeltrolle i sporenes vandring gjennom vann og luft. Molekylet tillater konidiene å overvinne overflatespenningen og penetrere i vannoppløsninger, samtidig som de beholder en beskyttende kappe i form av en luftboble rundt seg. (15) Den samme amfifile egenskapen gjør at de vegetative sopphyfene senere lett kan feste seg til ulike overflater, spesielt i faseoverganger, dvs overflater mellom luft og faste medier, faste medier og væsker. En viktig virulensfaktor for spredning, kolonisering og vekst i miljøet og eventuelt hos den humane vertens langs dennes epitelkledd ytre og indre overflater.

Dormante sporer

Overflaten med hydrofobiner og melaniner hos de dormante sporene virker også som effektiv kamuflasje. Dette rørlaget har blitt påvist å være immunologisk inert. Slik har dormante sporer ingen effekt med tanke på aktivering eller modning av dendritiske

celler og alveolære makrofager, men i stedet kan de blitt demonstrert å kunne hemme aktiveringen av T-celle immunresponsen *in vivo*. (16) For at sporene skal bli eliminert å kunne vekke en immunologisk respons, må de synliggjøre de immunologisk mer aktive komponentene av celleveggen som karbohydratene β -glukaner og galaktomannan. Dette skjer først når sporene sveller i forbindelse med germinering, f.eks i fagosomene til makrofager.

Adhesjon til ekstracellulær matriks

Hos den germinerende *Aspergillus* uttrykkes det i vekstfasen en rekke glykoproteiner og polysakkarider i celleveggen. Disse er kjent til å fasilitere hyfenes adhesjon til proteinene på epitelcellenes overflate og i det ekstracellulære matriks i humant vev. (17) Men sopphyfene må også bane sin vei gjennom mer faste barrierer som f.eks basallamina med flere typer kollagenstrukturer. Det har blitt påvist en rekke proteaser som virker på humant vev – elastaser, metalloproteaser, sure og alkaliske proteaser og fosfolipaser. (9, 18)

Enzymer

Sporer og cilier

Langs luftveiene vil de fleste konidiene bli fanget i mukuslaget. Det relativt seige men dog flytende slimet blir hos lungefriske kontinuerlig skjøvet mot svelget der det kvitteres ved svelging, hosting, nysing og spyting. Det finnes nå bevis for at sporene skiller ut toksiner som hemmer børstebevegelsen til ciliene i respiratorisk epitel og dermed hemmer eliminasjonen av mukuslaget med tilheftede sporene. (17, 19)

Hyfer og epitel

Neste steg i kolonisering og mulig invasiv vekst av sopp er deres mulighet til adhesjon til og penetrasjon av den fysiske barrieren – epitellaget. *Aspergillus fumigatus* sekreterer proteaser som disorganiserer den intracellulære strukturen ved å ødelegge aktinfilamenter, deriblant stressfibrene i alveolære epitelceller. Epitelceller vil forandre form, få ujevn overflate, vakuoliseres og miste sine fokale adhesjonsforbindelser. Dette åpner veien for hyfenes invasive vekst. (17) Mulig gjennom deorganisering av intracellulære transportveier og indre stress eller ved induksjon gjennom andre, reseptormediert signalveier, har *Aspergillus*-hyfene også evnen til å drive epitelceller til apoptose og forårsake fokal nekrose. (20, 21)

Makrofager og granulocytter

Drapsmekanismene hos profesjonelle fagocytter involverer produksjon av reaktive oksygen-, nitrogen- og kloridmetabolitter ved hjelp av NADPH-syntetase, iNOS og myeloperoksidase (MPO). For å uskadeliggjøre disse reaktive molekyler har *Aspergillus* utviklet enzymer som katalase og superoksiddismutase. (7)

Andre metabolitter

Det har også blitt påvist en lang liste med sekundære metabolitter hos *Aspergillus spp* – gliotoksin, restrictosin, verruculogen, fumagillin, helvolinsyre (fumigasin), ergot-alkaloider m.fl.(9) Funksjonen til mange av dem er ennå ikke kartlagt. En del av dem viser seg å være toksiske for den humane vert og kompromittere epitelcellenes integritet og immuncellenes funksjon. Ved siden av DHN-melanin er gliotoksin kanskje den best karakteriserte metabolitten. Stoffet produseres av enzymet epipolythiodioxopiperazine. Gliotoksin dannes rikelig av *Aspergillus*-hyfene under vekst og toksinkonsentrasjonen oppnår verdier som kan også måles i serum *in vivo*. (22) Toksinet viser seg å ha et bredt spekter av immundempende effekter hos den humane vert. Ved konsentrasjoner over

250 ng/ml har stoffet *in vitro* vist å kunne indusere apoptose hos makrofager og lymfocytter gjennom andre signalveier enn de ovennevnte antifagocytære.

1.5. Patogenese ved aspergillose

Aspergillus spp forekommer rikelig i vårt naturlige habitat – sporene finnes nesten overalt i luften, på alle overflater, i overflatevann og i jorden. Konidiene er lette og hydrofobiske og bæres lett med luften. Selv om soppsporer som er blitt påvist i drikkevann, har blitt genetisk identifisert som kulpable i en rekke tilfeller av invasiv aspergillose (12), skjer infeksjonen som regel gjennom luftveiene – via kolonisering av mukosadekkede nasale og bronkiale kaviteter og/ eller lungealveoler etterfulgt av invasiv vekst av hyfer inn i lungeparenkymet og dets kapillærer og lymfatisk vev. Selv om vi daglig eksponeres for flere hundre konidier av muggsopp, blir de aller fleste av oss ikke syke. Veien fra kolonisering til invasjon og disseminering hos en mottakelig vert kan betraktes å foregå i tre steg der soppen må overkomme tre forskjellige men innbyrdes avhengige forsvarslinjer og barrierer. Den første barrieren er av en mer fysisk art med flere immunologiske komponenter – et lag av mukos og respiratorisk epitel. Den andre barrieren utgjøres av stasjonære makrofager øvre og nedre luftveier. Den tredje linjen i forsvaret - nøytrofile granulocytter – aktiveres først når sporene har klart å germinere, kommer i vegetativ fase og begynner å vokse i form av hyfer. *Aspergillus spp* er opportuniste – de kan og vil framkalle sykdom kun hos verten som har svakheter, mangler ved én eller flere av disse tre barrierene.

1.5.1. Lungesyke

Mesteparten av de inhalerte sporene fanges i mukuslaget og transporteres ut av luftveiene og fjernes ved svelging, nysing, hosting eller spyting. Dette forutsetter at luftveiene – fra nesekaviteter til de minste bronkioler og alveoler - er dekket med frisk mukosa som er i stand til å produsere passende mengde og konsistens av mukos. Dette svikter f.eks hos pasienter med CF og astma. Disse pasientene står i fare for å utvikle aspergillomer og allergisk bronkopulmonal aspergillose - ABPA.

Slimlaget inneholder normalt også en rekke immunologisk aktive proteiner som defensiner, surfaktanter SP-A, SP-D, pentraxin-3, laktoferrin, ulike kitinaser, histatiner, sekretoriske immunglobuliner IgA, MBL, samt små mengder plasminogen og komplementfaktorer som skal kunne binde og opsonisere de inhalerte sporene. (2, 6, 7, 9) Dette svikter hos pasienter med immundefekter. Samtidig inneholder væsken i luftveiene ikke nevneverdige mengder med glukose og jern som vil kunne gi gunstige vekstvilkår i form av næring og byggestoffer til sopphyfene. Pasienter med endokrinologiske sykdommer har ofte også forstyrret regulering av mukuslagets sammensetning, blant annet når det gjelder glukose og pH.

I tillegg må mukuslaget, som kan fange opp betydelige mender med forurensning, deriblant *Aspergillus*-konidier, selv fjernes. Dette skjer som kjent ved hjelp av en kontinuerlig ciliebevegelse langs respiratorisk epitel. Skadet epitel og unormale kaviteter eller trange luftveier vil hindre passasjen av mukos og disponerer for germinering og kolonisering. Resultatet kan bli typisk runde ansamlinger av sopphyfer og –mycelier med tilkommende betennelsesceller og nekrotisk vev i sentrum – såkalt aspergillom, og kronisk nekrotiserende sinusitt. Dette gjelder spesielt pasienter med anatomisk unormale kaviteter som for eksempel de med gjennomgått tuberkulose, samt

de med KOLS og CF. Ofte har de i tillegg skader i mukosa og bildet kan kompliseres av atelektaser og bronkieektasier. Det er disse pasientene som står i størst fare for slike aspergillusinfeksjoner.

1.5.2. Makrofager – nedsatt fagocytose og utskillelse av betennelsesmediatorer

Den andre linjen i forsvaret utgjør de profesjonelle fagocytene – dendritiske celler og stasjonære makrofager i mukosa og i alveolene. Det har blitt påvist at de alveolære makrofagene er særdeles effektive til å eliminere soppsporer med en suksessrate på over 90%. (23) Som tidligere nevnt, vil fagocytterte konidier svelle i de syre lysosomene og avsløre immunologisk aktive overflatemolekyler - PAMP. Makrofagene som profesjonelle fagocytter tilhører den medfødte delen av immunforsvaret og har dermed en rekke membranbundne reseptorer av typen PRR - TLR2, TLR4, CD14, dectin-1 og mannosebindende lektiner MBL. Bindningen til slike reseptorer vil i tillegg til å fasilitere fysisk kontakt også starte en rekke intracellulære signalveier som fører til aktiveringen av makrofagen. Den aktiverte makrofagen vil da i sin tur være i stand til en mer effektiv fagocytose, samt til å sette i gang en passende immunologisk respons ved å skille ut en rekke inflammatoriske signalstoffer. Blant de best kjente er cytokinene IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 og TNF α . (6)

Hos pasienter som får langvarig terapi med høye doser med kortikosteroider som en del av behandlingen av sin grunnsykdom, blir også aktiveringen av makrofager hemmet. (24) Dette dreier seg først og fremst om organtransplanterte og de med alvorlige autoimmunologiske sykdommer som revmatoid artritt og Mb Crohn.

1.5.3. Nøytrofile granulocytter – kvantitative og kvalitative defekter

For en effektiv eliminasjon av germinerende hyfer og større kolonier er kroppen avhengig av mer dynamiske forsvarsceller - monocytter, cytotoksiske T-celler og aller viktigst - granulocytter. Nøytrofile granulocytter bruker de samme PRRene som makrofagene til å gjenkjenne sopphyfene. Etter tilheftingen og reseptorstimuleringen frigjør granulocytene sine granula som inneholder et spekter av antimikrobielle stoffer – proteaser, defensiner, pentraxin-3, lysozymer, laktoferrin og ROS, hovedsakelig produsert ved hjelp av det intracellulære enzymet NADPH-oksidasen. (25) Neutrofile granulocytter blir rekruttert og aktivert kjemotaktisk av cytokiner utskilt av makrofager og dendritiske celler. Men kjemotaksen, aktiveringen og effektiviteten av nøytrofile granulocytter kan bli hemmet av ulike sykdomstilstander og terapiformer. For eksempel er antallet funksjonelle granulocytter svært redusert hos pasienter med akutte leukemier og benmargssvikt. Men neutropenien kan også være iatrogen som et ledd i behandlingen med cytostatika hos nettopp leukemipasienter under induksjonskuren og ved hematopoetisk stamcelletransplantasjon (HSCT), samt ved behandling av solide maligne tumorer, autoimmune sykdommer og immunsuppresjonsbehandling etter organtransplantasjon.

En egen gruppe utgjør pasienter med en sjelden medfødt tilstand - kronisk granulomatøs sykdom, CGD. Sykdommen forårsakes av defekt i det fagocytære enzymkomplekset NADPH-oksidasen pga mutasjoner i genene som koder for de ulike delene av proteinkomplekset. Enzymkomplekset samles i membranen til fagolysosomer som

respons til inflammatoriske stimuli. NADPH-oksidase produserer superoksidanioner $O_2^{\cdot-}$ ved å overføre elektroner til oksygenmolekyler. Superoksidanioner blir deretter brukt til å lage en rekke ROS - hydroksylradikaler (OH^{\cdot}), hydrogenperokside (H_2O_2), peroksynitritanion ($ONOO^{\cdot}$) og hypoklorider ($HOCl^{\cdot}$) - alle med svært bakteri- og fungicide egenskaper. Hos pasienter med CGD vil katalasepositive bakterier og sopp (f.eks *Pseudomona spp*, *Candida spp* og *Aspergillus spp*) gi opphav til granulomer (derav navnet) som svar på kroniske betennelsestilstander der den patogene agens ikke kan elimineres definitivt pga defekt NADPH-oksidase. Av en hittil ukjent grunn er den ellers sjeldne *Aspergillus*arten *A. nidulans* ofte årsaken til sykdom og død hos pasienter med CGD. Aspergillose er fremdeles den ledende dødsårsaken hos denne pasientgruppen. (9) Selv om tilstanden er nokså sjelden med insidens rundt 1 per 250.000 – 500.000 fødsler (26), er patologien der illustrerende for hvor avgjørende nøytrofile granulocytter er for effektivt drap av *Aspergillus*hyfer.

Den adaptive delen av immunforvaret virker som kjent gjennom dannelse og aktivisering av spesialiserte T-celler og B-celler. Selv om man hos mange voksne har funnet sirkulerende antistoffer mot *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii* og *Aspergillus fumigatus* (2), er det usikkert hvor mye den adaptive delen av immunforsvaret bidrar til bekjempelse av soppinfeksjoner.

1.5.4. Genetisk variasjon

Det har også blitt oppdaget at genetisk variasjon hos pasienter i form av f.eks ulike fenotyper av immunceller kan beskytte eller disponere for en invasiv vekst av *Aspergillus*. Slik er polymorfismen i gener for TLR 4 (27) TLR 1 og 6 (28) og plasminogen-alleler (29) blitt assosiert med økt fare for invasiv aspergillose. Polymorfismen i gener for TNF- α og IL-10 kan virke både positivt og negativt for pasienter. Nedsatt evne til å produsere IL10 virker modulerende på immunsystemet. Cytokinet som utskilles først og fremst av Th2-celler, er kjent for å øke evnen til fagocytose hos stasjonære makrofager, men hemmer produksjon av andre proinflammatoriske cytokiner og rekrutteringen av neutrofile granulocytter og stagner dermed elimineringen av hyfene. For TNF- α er regnestykket motsatt – økt evne til produksjon fører til kraftigere inflammatorisk respons og raskere eliminering av soppmycel. (28)

På bakgrunn av empirisk kunnskap, som delvis støttes av den teoretiske forståelsen av patogenesen ved aspergillose og funksjonen til immunforsvarets ulike elementer, kan man stratifisere pasienter inn i ulike risikosoner. I en stor retrospektiv studie som omfattet 24 klinikker i Nord-Amerika om sammenhenger mellom *Aspergillus*arter, aspergilloseformer og ulike pasientpopulasjoner (11) fant man at ved påvisning av *Aspergillus* hos pasienten kunne man beregne risikoen for fremtidig utvikling av IA på bakgrunn av typen immundefekt. Den største risikoen løp pasientene med benmargssvikt, mens pasientene under medikamentell immunsuppresjon kun hadde en moderat risiko jamført med den første gruppen (se Tabell 1.5).

Tabell 1.5 Risikoen for å utvikle invasiv aspergillose ved funn av aspergillus hos utsatte pasienter, retrospektiv studie fra 1995, 24 sentre i Nord-Amerika (11).

Risikogruppe	Tilstand	Risiko
HØY	allogen benmargstransplantasjon	64 %
	neutropeni	64 %
	hematologisk malignitet	50 %
INTERMIDLÆR	autolog benmargstransplantasjon	28 %
	feilernæring	27 %
	kortikosteroider	20 %
	HIV	19 %
	organtransplantasjon	17 %
	diabetes mellitus	11 %
	lungesykdom	9 %
	annen malignitet	8 %
LAV	CF	0.7 %
	bindevevssykdom	0 %

1.6. Kliniske manifestasjoner av aspergillose

Infeksjoner med Aspergillus kan få varierende kliniske uttrykk og forløp. Utfallet er mest avhengig av pasientens underliggende sykdomstilstand og immundefekt. I tillegg til de overfladiske mykosene som keratokonjunktivitt, ekstern otitt og diverse dermatoser, kan man se tilstander som allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), aspergillom, kroniske nekrotiserende aspergilloser og invasive aspergilloser. (2)

1.6.1. ABPA

Allergisk bronkopulmonal aspergillose er karakterisert med astmalignende residiverende episoder med pustebesvær, bronkospasmer, rikelig mukusproduksjon som kan føre til dannelse av slimplugger, stenose av bronkioler og atelektaser. Syndromet er en slags hypersensitivitetsreaksjon – hos flertallet av pasientene kan man finne høyt totalnivå av IgE og Aspergillus-spesifikt IgG. (2) Tilstanden er ofte kronisk og progredierende og vil uten terapi kunne føre til lungefibrose og bronkiektasier.

1.6.2. Aspergillom

Aspergillus kan også kolonisere anatomisk unormale preformerte hulrom som for eksempel kaviteter etter gjennomgått tuberkulose, atelektaser og bronkiektasier etter kroniske bronkitter og CF. Slike kolonier kan vokse seg store og lage betydelig runde aggregater av mycelier – sk soppball, på engelsk *fungus ball*, aspergillom. Som regel har pasienter ingen symptomer utover at den lokale inflammasjonen rundt aspergillomet kan erodere slimhinnen og gi blødninger med påfølgende hemoptyse.

1.6.3. Nekrotiserende aspergillose

Hos sterkt immunkompromitterte pasienter kan aspergillus også kolonisere andre hulrom langs lufteveiene. Ved infeksjon av bihulene kan germinerende hyfer lett invadere det omfattende blodårenettverket her og føre til trombose og påfølgende nekrose av vev. Slike nekrotiserende sinusitter kan ved terapivikt spre seg til orbita eller inn i kraniet. Av en hittil ukjent grunn har arten *A. flavus* spesielt tendens til å gi slike infeksjoner. (2)

1.6.4. Invasiv aspergillose

Den mest fryktede og farligste formen for aspergillose er den invasive aspergillosen (IA). Tilstanden kalles også invasiv pulmonal aspergillose (IPA) siden den som regel starter i lungene med koloniseringen av bronkioler og alveoler med soppsporene som klarer å germinere der. Pasientene utvikler typisk klinisk pneumoni med feber, hoste, dyspne, eventuelt ledsaget av pleurittiske brystmerter. Men ved fravær av betennelsesrespons, f.eks pga immunsuppresjon, kan en langvarig og/ eller residiverende feber være det eneste kliniske symptomet på begynnende IA. Som tidligere nevnt har Aspergillus-hyferne tendensen til å invadere blodårer. Dette kan føre til inflammasjon og trombose med påfølgende lokale iskemiske skader og vevsnekroser. Forløpet videre med tanke på histopatologi, klinikk og prognose følger to hovedscenarier avhengig av pasientens underliggende tilstand og immunstatus. Slik gir det mening å skille mellom IA hos neutropene og ikke-neutropene pasienter. Neutropenien har i denne sammenheng ikke nødvendigvis en klart definert tallverdi, men gir heller uttrykk for graden av dysfunksjonen av den delen av immunforsvaret.

Hos sterkt immunkompromitterte med *grav neutropeni* sees det ofte en rask og omfattende vekst av hyfer med påfølgende angioinvasjon, vaskulær disseminering, trombosetendens og blødninger. Tilstanden progredierer ikke sjelden raskt til respirasjonssvikt som fører til døden i løpet av få dager hos opp til 80 - 95 % av pasientene. (9, 30)

Hos pasienter med *lett eller ingen neutropeni*, men som er under sterk kortikosteroidterapi (f.eks organtransplanterte) har IPA en ganske annen karakter. Vevspatologisk sees det sjelden angioinvasjon, men heller lokaliserte pyogranulomatøse og nekrotiske inflammasjonsloci. Steroider hemmer som kjent fagocytose, dannelsen av ROS, utskillelsen av cytokiner og cellevandring. (24) Flere studier har påvist at kortikosteroider i tillegg hemmer de profesjonelle fagocytene i å drepe konidiene og hyferne til *A. fumigatus*. (9) Granulocytene som finner frem til infeksjonssteder stopper som regel hyfenes vekst, men gir samtidig en kraftig inflammasjonsreaksjon lokalt med omfattende vevsskade som følge. IPA kan slik bli en mer kronisk tilstand som kompliseres med multifokale nekroser/ abscesser og dannelse av kaviteter. Det er nettopp denne omfattende skaden på lungeparenkymet som kan bli fatal for pasientene i denne gruppa.

Siden Aspergillus hyfer ikke respekterer vevsgrenser og lett invaderer blodårer, havner mange løsnede fragmenter av hyfer i systemisk sirkulasjon. Dette kan føre til disseminert aspergillose og gi opphav til abscesser teoretisk i hele kroppen. I praksis forekommer disse oftest i godt sirkulerte organer som milt, lever, nyre, hjerne og hjerte, men også benmarg og hud kan angripes. Abscessene vil igjen føre til lokal trombose og iskemi med organspesifikke utfall.

Det er mange likheter men også ulikheter når det gjelder de underliggende immundefektene og det følgende kliniske og histopatologiske bildet hos forskjellige pasientgrupper. En oversiktlig sammenfatning og sammenligning av de ulike aspektene presenteres godt i Tabell 1.6.

Tabell 1.6 Vertsfaktorer og histopatologi ved invasiv aspergillose (oversatt fra (6))

Pasientgruppe	Disponerende vertsfaktorer	Kliniske og histopatologiske trekk
akutt leukemi, myelodysplastisk syndrom, aplastisk anemi annen benmargssvikt	Neutropeni	Hyfer invaderer blodårer, tromboser og vevsinfarkt, beskjeden inflammatorisk respons, mulig nekrotisk hulromdannelse.
allogen HSCT etter aplasifasen	immunsuppresjon mot GVHD (steroider, TNF- α hemming og T-celle utmattelse)	Inflammatorisk pneumoni, hyfer i åreveggene, koagulasjonsnekrose.
organtransplanterte	immunsuppresjon mot avstøtningsreaksjon	Vidt spekter fra akutt pneumoni til kronisk nekrotiserende aspergillose, hos lungetransplanterte kan trakeobronkitt forekomme og anastomoselinjen kan eroderes.
langkommen AIDS	CD4+ tall <100 celler/ μ l ofte flere infeksjoner	Akutt eller sakte progredierende nekrotiserende pneumoni. Varierende histologisk bilde med angioinvasjon, neutrofilinfiltrater, innkapslede abscesser, hulromdannelse, ev disseminert ekstrapulmonal spredning
CGD	defekt NADH-oksidas	Akutt eller sakte progredierende pneumoni uten angioinvasjon eller koagulasjonsnekrose.
strukturell lungesykdom som emfysem, bronkiektasier, tuberkulosekaverner ol	ofte komorbiditet i form av diabetes, underernæring, inhalasjonssteroider	Kronisk nekrotiserende pulmonal aspergillose med sakte progredierende invasiv pneumoni og følgende inflammasjon og vevsnekrose.
aspergillom	preformerte hulrom, f.eks bronkiektasier og tuberkulosekaverner	Dannelse av soppball som består av hyfer og nekrotisk vev. Erosjoner i kaviteitsveggene kan føre til blødninger. Kirurgi som regel nødvendig.
ABPA	allergisk tilstand, kan komplisere CF	Tetting av luftveier med propper av hyfer, slim og inflammatoriske celler, ingen invasive hyfer i lungeparenkymet. Eosinofilinfiltrater, begercellehyperplasi, ev bronkiektasier.

1.7. Diagnose av aspergillose

Aspergillus spp er opportunistiske muggsopp som finnes rikelig i vårt miljø – i luften, i vann og i jorden. Lette, luftborne konidier spres fort i atmosfæren og forurenses dermed inhalert luft og kan påvises i prøver fra luftveiene både som tegn på kolonisering av mukosa, ekte infeksjon eller som kontaminering av prøven på laboratorier. Det finnes

over 180 arter i denne soppfamilien og 33 av dem har blitt assosiert med sykdom hos mennesket. Majoriteten av disse kan tilskrives *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, and *A. niger*, og hos pasienter med kronisk granulomatøs sykdom – *A. nidulans*. (11, 31, 32)

Tidlig og presis diagnose er viktig og ofte avgjørende for å oppnå god behandlingseffekt. Ved invasiv aspergillose (IA) handler det ofte om overlevelse. Å diagnostisere infeksjoner med *Aspergillus* hos pasienter *ante mortem* er ikke en enkel oppgave. Det finnes et stort antall primære forskningsartikler om ulike diagnostiske verktøy, og i den senere tid har det også blitt publisert en rekke oversiktsartikler om og metaanalyser av effektiviteten til både eldre og nyere tester.

I takt med økt samarbeid mellom helseinstitusjoner og –myndigheter som strekker seg over landegrensene og kontinenter, har man prøvd å lage konsensusbaserte diagnosekriterier, og det er blitt opprettet samarbeidsgrupper for videre forskning.

Jeg skal i det følgende presentere spekteret av muligheter for diagnose av IA. Jeg tar utgangspunkt i den nyeste oversiktsartikkelen publisert i 2005 i *The Lancet Infectious Diseases*. (31) Jeg kommer i tillegg supplere med andre relevante forskningsfunn, oversiktsartikler og metaanalyser.

1.7.1. Direkte metoder

Grovt sett kan man dele diagnosemetodene i to hovedgrupper – direkte og indirekte metoder. Metodene i den første gruppen, som fremdeles danner gullstandarden, går ut på å påvise den patogene agens *in situ* eller i aspirater direkte ved hjelp av mikroskopi, godt hjulpet av diverse fargemetoder. Metodene i den andre gruppen gjør derimot bruk av ulike surrogatmarkører som tegn på foreliggende invasiv soppinfeksjon.

Mikroskopi

Mikroskopet er fremdeles mikrobiologenes uerstattelige arbeidshest. Ved hjelp av observasjon av både soppelementer og vevsreaksjoner kan den erfarne mikrobiolog foreta en bestemmelse av den patogene agens.

Styrke: God sensitivitet. Mye raskere enn dyrkning.

Svakheter: Ikke mulig å skille sikkert mellom ulike arter av filamentøse sopp.

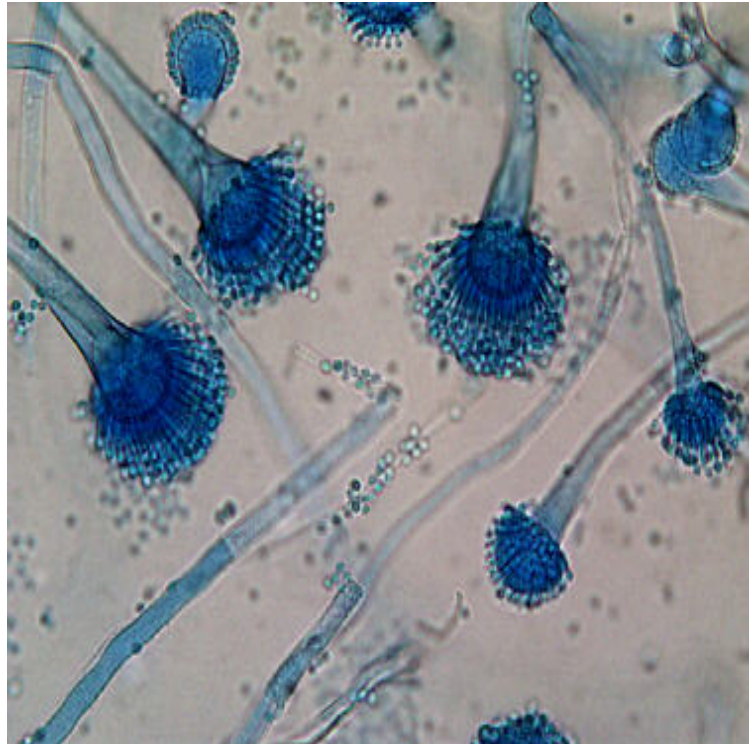
OBS: Det er fare for å implisere tilfeldig koloniserende *Aspergillus* som den patogene agens ved inflammatoriske reaksjoner av annen etiologi.

Morfologi

Karakteristisk morfologisk utseende av *Aspergillus* er smale hyfer med regelmessige septae og dikotome delinger som danner spisse vinkler på 30-45 grader. Hyfene kan danne makroskopisk synlige mycelier på frie overflater. Man kan se etter konidier i makrofagenes fagosomer. Vevsreaksjonen bærer ofte preg av infiltrasjon av nøytrofile granulocytter, alternativt granulomatøse forandringer med ansamlinger av mononukleære celler og nekrotisk vev. *Aspergillus*hyfene kan ofte sees i nærheten av og med innvekst i blodkar – sk angioinvasjon.

Ofte er observasjon av smale, septate hyfer med spissvinklede dikotome forgreninger nok til å konkludere med at det dreier seg om *Aspergillus*. Et mer konservativt syn krever dog observasjon av fruktlegemer - de sporulerende hodene til aspergillusmakrokonidier med kjeder av sporer (figur 1.1). Det har til og med blitt sagt (5):

This writer would no more claim identification of a filamentous fungus without demonstration of the sporulating structures than he would attempt morphologic specification of gram-negative rods in a tissue section.



Figur 1.1 Hyfer og sporulerende makrokonider til *aspergillus* (fra (33)).

Problemet er på den ene siden at dannelsen av sporulerende aspergillushoder krever tilstedeværelse av rikelig med oksygen noe som ikke er tilfelle i dype vevsprøver. Samtidig er det en rekke andre sopparter som kan ligne vekstmønsteret til aspergillus – phycomycetes, penicillinum og enkelte Candidaarter. Balanseringen mellom mer eller mindre konservative tilnærminger er en kjent problemstilling i diagnostikken som illustrerer avveiningen mellom sensitivitet og spesifisitet ved alle tester. Vekstmønsteret til selve *Aspergillus* kan også variere og dermed mimikere andre sopparter. *Aspergillus* er ikke en obligat patogen sopp, og kan foreligge rikelig som opportunist og kolonisorator. Således kan påvisning av *Aspergillus* i ikke-sterile kroppsrom, selv med passende vevsreaksjon, vise seg å være et falsk positiv funn med tanke på identifikasjon av den patogene agens. De karakteristiske aspergillushyffene kan maskere den egentlige agens som ikke behøver å være så godt synlig.

Utstryk

Man kan foreta direkte mikroskopering av aspiratutstryk og avstøpninger av ferske snitt før farging. Ved å tilsette 10% KOH kan man eventuelt oppløse humane celler og kunne observere sopphyfer direkte.

Farging

Etter fikseringen med 10% neutral bufret formalin av utstryket eller biopsimaterialet skal alle preparater farges med vanlig hematoksylin-eosin (HE). Patologen vil kunne danne sin mening om den histopatologiske prosessen, identifisere de ulike inflammatoriske cellene og observere forandringer i vevsarkitekturen. Soppelementene vil farges på lik linje med vertsceller og lar seg vanskelig skille fra humane vevselementer. Farging med spesielle soppfarger som binder til ulike bestanddeler i celleveggen til hyfer, sporer, cyster og eventuelle gjærsopp, øker muligheten for identifikasjon.

GMS

Grocott methenamin silver, også kjent som *Gomori's methenamin silver stain* er en fargemetode der sølvnitratet i fargestoffet binder til oksiderte karbohydrater i soppens cellevegg.

Styrke: Farger soppelementene sterkt svart mens bakgrunnsvevet blir hyperoksidert og dermed blekt slik at soppelementene, som kan være få og små, bedre kommer til syne – øker sensitiviteten. Dette er standard histokjemisk metode for påvisning av soppelementer i biopsier og cytologiske utstryk.

Svakhet: Nettopp det at man mister muligheten til å observere vevsreaksjonen i umiddelbar nærhet. Bakgrunnfarge er vanligvis malakitt-grønt. Dersom man velger HE som bakgrunnfarge, kan man synliggjøre vertscellene bedre, men samtidig kan man få artefakter siden humane cellekjernerester farges sterkt av hematoksylin og kan slik forveksles med soppelementer.

OBS: På grunn av fargestoffenes og målcellenes varierende fargeevne bør det alltid foretas parallellfarging av kjent positiv prøv - f.eks standardprøver av *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* og *Aspergillus fumigatus*.

PAS

Periodic acid-Schiff er en fargemetode der oksiderte polysakkarider blir farget med et spesielt fargestoff.

Styrke: Farger polysakkarider i humant vev og celler like bra og detaljene arkitekturen i vertsvevet bevares.

Svakhet: Mindre kontrast mot elementer i vertsvev, slik at små og få sopp kan bli uoppdaget, særlig gjelder dette biopsier fra parenkymatøse organer hvor celler og mucin i stor grad også farges PAS-positivt. PAS-farging anses best egnet for påvisning av sopp i hud- og slimhinnebiopsier.

Fluorescence-teknikker

Det har blitt utarbeidet en rekke fargestoffer – Calcofluor white, Uvitex 2B, Blankophor. Felles for disse fargestoffene er at de fester seg til β -glykosidbundne polysakkarider i soppens cellevegg. Fargemetoden kan brukes på frysesnitt, parafinfixerte snitt og ferske snitt, samt BAL-væske og hornhinneavskrapninger.

Styrke: Bredt anvendelig. Relativt høy sensitivitet.

Svakhet: Farger nær sagt alle typer sopp, ikke spesifikk for *Aspergillus* eller muggsopp. Denne metoden brukes lite i patologisammenheng, men er utbredt ved mikrobiologiske avdelinger.

Immunhistokjemi

Med utviklingen av monoklonale antistoffer mot *Aspergillus*, f.eks WF-AF-1 og EB-A1, koblet til fluorescensteknikk f.eks ved hjelp av enzymer, kan man påvise soppelementer så vel i utstryk som i snitt.

I snitt benyttes antistoffene med permanente enzym-kromogener som standard immunhistologisk metodikk. Dagens antistoffer anses spesifikke og sensitive for hovedgruppene candida og aspergillus, men kan ikke benyttes for subtyping av candida eller aspergillus spp. Vi har ikke greid å inntitrere immunfarging for cytologiske utstryk, kun for formalinfixert biopsimateriale.

Styrke: Er svært spesifikk og gir artsspesifikk identifikasjon. Kan være mer sensitiv enn dyrkning.

Svakhet: Tilgjengeligheten varierer mellom laboratorier. Bindningen og adsorpsjonen varierer og bestemmelsen av titer kan bli subjektiv. Det må alltid gjøres inntitrering av

nye antistoffer med kjent positiv prøve. I det testen er lite etterspurt mangler mange laboratorier slike antistoffer. Utførelsen stiller også høye krav til nøyaktighet, systematikk og konsekvente rutiner, i våre dager gjerne automatiserte teknikker.

Dyrkning

Aspergillus vokser fint i de fleste faste og flytende media – blodagar, sjokoladeagar, hjerne- og hjerteinfusjonsbuljong. Det bør alltid inkluderes den soppspesifikke Sabourauds dektroseagar. For å øke sensitiviteten, spesielt ved prøver fra ikke-sterile kroppsrør, kan det tilsettes antibiotika (f.eks kloramfenikol og gentamicin) for å hindre overvekst av bakterier. Ved avlesning vurderer man morfologien og fargen til koloniene. Dog krever en sikker artsbestemmelse en detaljert inspeksjon av morfologien og ontogenesen til soppen, samt ”teased”-preparater eller ”slide”-dyrkning der man prøver å få frem sporuleringen til Aspergillus. (31)

Styrke: Positivt svar kan fastslå diagnosen aspergillose. Gir muligheten til videre resistensbestemmelse.

Svakheter: Tidkrevende. Lav sensitivitet, selv ved påvist invasiv aspergillose kan dyrkningen være negativ. Krever god ekspertise for mikroskopering og artsbestemmelse. **OBS:** Aspergillus kan vokse atypisk og morfologisk ligne på andre arter. Det lykkes ikke alltid å fremkalle sporulering selv under optimale betingelser. Det er særlig i disse tilfeller at immunhistologisk påvisning i vev kan hjelpe i artstypebestemmelsen.

1.7.2. Indirekte metoder

Siden dyrkningen er tidkrevende og har lav sensitivitet – blodkultur forblir ofte negativ selv ved spredt disseminert IA (2, 34) - og henting av prøvemateriale fra lunger innebærer mer eller mindre invasive inngrep hos pasienter som i utgangspunktet er alvorlig eller kritisk syke, har man i lengre tid prøvd å finne alternative metoder for å påvise aspergillusinfeksjoner generelt og IA spesielt. Slike surrogatmål kan være molekyler fra soppens cellevegg, intra- og ekstracellulære proteiner eller produkter av soppens metabolisme.

Galaktomannan

Galaktomannan (GM) er et varmemestabilt polysakkarid som finnes i celleveggen til de fleste Aspergillus og Penicillium spp. Molekylet består av en ikke-immunogen mannankjerne med immunogene sidekjerder av varierende antall galaktofuranosylenheter. GM-antigenet kan variere noe mellom ulike sopparter og er avhengig av måten av fremstilling, ekstraksjon og rensing. Målingen av GM gjøres ved hjelp av enzymkoblede immunoassay (EIA/ELISA). Til binding av GM har det blitt derivert hos rotter monoklonale antistoffer (EB-A2) mot β -(1,5)-koblet galaktofuranosid-sidekjerderester. GM-assays kan brukes på et bredt spekter av flytende prøvematerialer: serum, BAL-væske, CSF, peritonealvæske, perikardvæske og urin.

Styrke: Mengden GM korrelerer godt med totalmengden av sopp, sk *fungus load*.

Estimeringen av *fungus load* gir muligheten til å vurdere responsen på og effekten av behandling. *Fungus load* har også en viss prognostisk verdi. (35)

Svakheter: Usikkerhet knyttet til utskillelse og kinetikken av GM *in vivo*.

I en enkel *in vitro* studie påviste en nederlandsk forskergruppe (36) at utslippet av GM og andre celleveggskomponenter var størst i soppens eksponentielle vekstfase, som ved kolonisering og etter at antimykotika hadde mistet sin virkning. Samtidig demonstrerte

forskerne at bruken av antimykotika, som ved profylakse, senket konsentrasjon av GM betraktelig.

Sensitivitet

Den kliniske sensitiviteten er beheftet med betydelig variasjon – den har blitt målt i området 29 – 100%. (37) Variasjonen har blitt tilskrevet faktorer som ikke-standardiserte prøvetakingsprosedyrer, samtidig antimykotisk behandling og ulike pasientpopulasjoner. Hos sterkt immunkompromitterte pasienter har sensitiviteten blitt målt til over 90%, mens hos organtransplanterte og CGD er den noe lavere.

Spesifisitet

Den kliniske spesifisiteten har generelt vært over 90%. Noe lavere hos nyfødte og småbarn der man tror at GM fra maten har blitt translokert over umoden eller skadet tarmmukosa. Det har også blitt rapportert kryseaksjoner med enkelte antibiotika, som piperacillin-tazobactam og amoxicillin/clavulansyre, andre filamentøse sopp, enkelte bakterier og til og med bomullsredskaper som har kommet i kontakt med prøvematerialet. (31)

I en metaanalyse (38) der det til slutt ble inkludert 27 studier fra perioden 1966-2005 om bruken av GM-assay for påvisning av IA, ble testparametrene beregnet til følgende:

Sensitivitet: 0.71 [95%CI:0.68-0.74]

Spesifisitet: 0.89 [95%CI:0.88-0.90]

Logaritmisk OR: 2.74 [95%CI:21.12-3.36]

Ved målinger av kontinuerlige variable, er det alltid spørsmål om hvor man skal sette grensen, sk *cut off-value*, som skal skille mellom positive og negative resultater. GM-assays leses av som Optical Density Index (ODI). Med økende *cut off-value* vil spesifisiteten forbedres, men samtidig vil man miste i form av sensitivitet (se Tabell 1.7)

Tabell 1.7 Metaanalyse fra 2008 om *cut off-value* og sensitivitet og spesifisitet (39)

ODI	0.5	1.0	1.5
Sensitivitet	0.78 [95%CI:0.61-0.89]	0.75 [95%CI:0.59-0.86]	0.64 [95%CI:0.50-0.77]
Spesifisitet	0.81 [95%CI:0.72-0.88]	0.91 [95%CI:0.84-0.95]	0.95 [95%CI:0.91-0.97]

Forfatteren av oversiktsartikkelen konkluderer med at ved en gitt medianprevalens av IA på 8% vil det i en pasientpopulasjon på 100 være 8 som utvikler IA. Ved å velge ODI på 0.5 som *cut off-verdi* vil man miste diagnosen hos 2 av dem og behandle eller undersøke videre 17 pasienter unødvendig. Ved å velge ODI på 1.5 vil man miste diagnosen hos 3 (av 8 som fikk IA), samtidig som man behandler unødvendig 5 pasienter.

I USA har den lokale tilsynsmyndigheten FDA godkjent Platelia ELISA for GM med *cut off-verdi* for ODI på 0.5. Og selv om produsenten selv har foreslått ODI på 1.5, mener flere eksperter at indeks på 0.5 vil øke sensitiviteten mer enn spesifisiteten vil senkes tilsvarende.(40) I en klinisk situasjon der man monitorerer høyriskopasienter og screener blodprøvene for sirkulerende antigener, har det blitt foreslått at man heller bør legge mer vekt på en eventuell økning av GM som et tidlig tegn på IA og sette i gang adekvat behandling selv om verdien ikke (ennå) har nådd en bestemt *cut off verdi*. (37)

Det foreligger foreløpig ingen konkrete evidensbaserte retningslinjer når det gjelder testing av GM, men det er ingen tvil om at deteksjon av GM vil forutgå radiologiske funn og utviklingen av klinikken.(41) I en oversiktsartikkel (28) konkluderes det med at GM-testing i serum egner seg best hos neutropene pasienter, både som en del av overvåkningsregimet og som monitorering av terapieffekten. Hos ikke-neutropene pasienter kan testing av BAL brukes idet den har høy negativ prediktiv verdi og slik vil en kunne utsette en potensielt farlig antimykotisk terapi som profylakse.

Bruken av dobbel-sandwich ELISA GM assay ble i 2005 inkludert i de nye reviderte konsensuskriteriene for diagnosen av IA. (42) De siste 10 årene har både europeiske og amerikanske laboratorier brukt den kommersielt tilgjengelig Platelia ELISA-testen som også er tilgjengelig i Norge.

β-(1,3)-D-glukan

β-glukaner er en bestanddel av celleveggen hos de fleste sopparter, med viktige unntak av *Cryptococcus* og *Zygomycetes*. Som prøvemateriale brukes pasientens serum eller plasma. Felles for alle testene er at de bruker egenskapen hos dette molekylet til å aktivere koagulasjonskaskaden hos amoebocytene som er derivert fra hemolymfen til hesteskokrabbene.

Styrke: Generelt høy sensitivitet og høy negativ predikativ verdi. Tidligere diagnose (median 10 dager (43)) enn ved positiv dyrkning, radiologiske tegn og kliniske manifestasjoner.

Svakhet: Ikke artsspesifikk.

Klinisk sensitivitet og spesifisitet:

I ulike studier har sensitiviteten variert fra 55-95% og spesifisitet fra 77-96%.(41)

Variasjonen kan skyldes ulike cut off verdier, ulike tester, forskjellige pasientgrupper og ulik studiedesign.

Helsemyndighetene i USA (38) har godkjent bruken av spesielt Fungitell til påvisning av invasive mykoser. Til testen brukes det pasientserum eller –plasma på mikrotiterplate der substratet tilsettes. Et spektrofotometer leser av resultatene ved å bestemme den optiske tettheten i de ulike punktene i matrisen. Følgende cut off-verdier brukes:

BG <60 pg/mL = negativ

BG 60- 79 pg/mL = intermediær

BG >80 pg/mL = positiv

Negativ predikativ verdi har vært målt til 100 % ved ulike studier med ulike pasientpopulasjoner. (43, 44)

Sensitivitet: Fungitell kan detektere β-(1,3)-D-glukan (BG) konsentrasjoner ned til 1 pg/mL.(31)

Spesifisitet: Som kjent finnes BG hos de fleste sopparter. Samtidig har det blitt rapportert falsk positive prøver ved hemodialyse, hjert-lunge-bypass, bruken av immunglobulinprodukter, antibiotika som amoksisillin-klavulinsyre og ved bruk av glukanolholdig forbindningsmaterieell i forbindelse med kirurgiske prosedyrer.

Det har blitt utviklet flere kommersielle tester: Wako, Glucatell, Fungitec-G og Fungitell. Felles for alle er at de krever forberedelse av prøven. Human plasma må renses for en rekke naturlig forekommende serinproteaseinhibitorer og deretter må lysatets endotoksin elimineres.

Bruken av BG-tester har på lik linje med GM-tester blitt inkorporert av konsensuskomiteen i testapparatet for diagnose av IA. (42)

GM eller BG?

GM og BG er begge bestanddeler i soppens cellevegg. Begge har tilnærmet lik kinetikk med økning i vekstfasen og proporsjonell relasjon til totalmengden av sopp i kroppen – ”fungal load”. (36) GM er nokså spesifikk for *Aspergillus*, eller i hvertfall filamentøse sopp, mens BG er en mer uspesifikk men tidlig og sensitiv for generell invasiv mykose. I en sammenlignende studie der man screenet 40 høyrisikopasienter med serologiske prøver to ganger ukentlig (45), fant man at begge testene hadde lik sensitivitet (0.88), spesifisitet (0.9), PPV (0.7), NPV (0.96) og andel falsk positive svar (10,3%), men at de sistnevnte forekom hos forskjellige pasienter. Kombinasjon av resultatene vil hjelpe å identifisere slike falsk positive, siden hos pasienter med påvist IA skal begge testene være positive. Ved å sammenholde GM og BG økte man spesifisiteten og PPV til 100% uten å påvirke sensitiviteten og NPV. I tillegg ble det notert at BG tenderte til å bli positiv noe før GM.

Andre metabolitter

Som tidligere nevnt innehar *Aspergillus spp* en rekke primære- og sekundære metabolitter. Alle har de, i hverfall teoretisk, potensiale til å bli detektert som surrogatmål ved diagnostisering av aspergillose.

D-mannitol

Denne bestanddelen av soppens cellevegg har blitt påvist eksperimentelt hos pasienter med IA. (31) Men deteksjon og måling av molekylet er komplisert. Metoden krever bruk av gasskromatografi og massespektrometri.

Gliotoksin

Mykotoksinet gliotoksin produseres rikelig hos de fleste *Aspergillus spp*. Dette toksinet har blitt påvist å ha en rekke immunsuppressive egenskaper (se kap 2.4.1). I en eksperimentell studie (22) klarte forskerne å isolere toksinet både i lungehomogenatet og i serum hos *A fumigatus*-infiserte mus i gjennomsnitt i 72.9% av prøvene. Studiet ble videreført hos 16 kreftpasienter. Hos pasientene, som alle fikk antimykotisk behandling, ble gliotoksinet påvist hos 2 av 11 uten dokumentert IA (falsk positive, eller før en sikker diagnose) mot 4 av 5 med bekreftet eller sannsynlig IA, dvs sensitivitet på 80% ($p=0.04$).

Ekstracellulært glykoprotein

I 2008 publiserte Christopher R. Thornton (46) resultatene av sin forskning der han ville finne et annet *Aspergillus* antigen som kunne være mer spesifikk enn GM-testene, dvs uten mulige kryssreaksjoner med falsk positive svar. Han lyktes å lage monoklonale musantistoffer JF5 som binder til et proteinepitop i hyfenes cellevegg og septae. Antigenet skilles ut på lik linje med GM under soppens vekstfase. Antistoffene er svært spesifikke – ved siden av *Aspergillus spp* ble det påvist reaktivitet kun mot enkelte nært beslektede sopp, samt kryssreaktivitet mot enkelte *Penicillium*-arter. Men til gjengjeld ble det ikke observert kryssreaktivitet mot andre aktuelle invasive sopparter som *Candida spp* o.l. Det ble heller ikke observert kryssreaksjon mot bakterier eller antibiotika.

Sensitiviteten var i samme klasse som for Platelia GM - antigenproteinkonsetrasjoner på 1.25 ng/ml i rent saltvann og 35 ng/ml i humant serum.

Selve testen gjør bruk av en teknologi kalt *lateral flow* der man bruker gullkonjugerte antistoffer og antistoffer festet på porøs nitrocellulosemembran. Den immunokromografiske teknologien med lateral flow har vært kjent i mange år og vært brukt i hjemmetester for graviditet, samt for påvisning av bakterier, virus og diverse toksiner i klinikken. Det finnes allerede en lignende test for påvisning av Candida. (47) Fordelen ved denne typen teknologi er at den ikke er invasiv (basert på pasientserum), den er relativt billig og rask (15 minutter), og krever ingen ekspertise eller bruk av laboratorier.

2PF

Det har også blitt gjort forsøk å ta i bruk en annen ikke-invasiv metode – nemlig pusteprobe. (48) 2-pentyl furan er et sk *volatile organic compound* (VOC). Molekylet er lite vannløselig og flyktig av natur. Molekylet produseres av bl.a lipooksygenaser. Stoffet forefinnes i rikelige mengder hos *A. fumigatus* og *Fusarium spp*, men også i noe mindre grad hos *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Scedosporium spp* og *Streptococcus pneumoniae*. Molekylet kan detekteres ved hjelp av en sk elektronisk nese, selektiv ionmassespektrometri (SIFT), ionemobilitetsspektrometri (IMS) og gasskromatografi med massespektrometri. Pustemetoden vil være attraktiv, siden den ikke er invasiv samtidig som den henter prøvemateriale nær infeksjonsfokus – i utåndningsluften fra lungene. I sine forsøk klarte forskerne å påvise 2PF hos alle pasienter som var infisert eller kolonisert med *A.fumigatus*, samtidig som friske personer og neutropene pasienter uten sopp testet negativt. 2PF forsvant hos pasientene etter vellykket terapi og korrelerte med isolering av agens i sputum og pleuravæske samt CT-funn. Men selv om metoden virket lovende i forsøk, er den ennå ikke blitt validert. Man har ikke heller kartlagt muligheten for falske positive svar ved andre lungesykdommer eller om eventuelt molekylet, som kan finnes i mat, kan ta seg over tarmmukosa, bli fraktet med blodsirkulasjonen og havne i utåndningsluften.

Antistoffer

Det kan påvises antistoffer mot *Aspergillus fumigatus* hos alle friske personer. Dette kan skyldes den kontinuerlige eksponeringen for konidiene i luften som med jevne mellomrom havner i alveoler og blir destruert av makrofagene der. Som regel er konsentrasjonen av dem svært lav, men ved to typer aspergillose – ABPA og aspergillom - der eksponeringen er langvarig og relativt kraftig, kan man detektere høyere nivåer av *Aspergillus*-spesifikke humorale IgE og IgG. (34) Antistoffene kan være rettet mot såvel antigener i soppens cellevegg som deres ekstracellulære enzymer og – toksiner. Det har også vært brukt en rekke ulike teknikker for avdekking og måling av antistoffene: immunodiffusjon, counter immunoelektroforese, komplementfiksasjon, partiell agglutinasjon, indirekte immunofluoresense, radioimmunoassay og ELISA. (31)

Mitogillin

Hos pasienter med ABPA med høye titre av IgE ble det også funnet høye konsentrasjoner av antistoffer rettet mot et enzym hos *Aspergillus fumigatus* – Asp1f1.(34) Enzymet, som er en RNAase, hører til cytotoksinfamilien mitogilliner og dets funksjon hos *Aspergillus* er foreløpig ikke kjent. I en studie av serum fra pasienter med IA og aspergillom ble det observert god korrelasjon mellom IgG titre mot (rekombinant) Asp1f1 og klinisk sykdomsaktivitet. Det ble funnet positive prøver hos 100% av pasienter med aspergillom, 64% med IPA og 60% med disseminert aspergillose, mot 1,3% hos friske kontrollpersoner.(49)

Per dags dato brukes måling av antistoffer i praktisk klinisk hverdag i beskjeden grad. Kun for å stille diagnosen ABPA kreves det at man klarer å påvise høyt nivå av aspergilluspesifikke IgE og IgG. (50) (41) Men antistoffer kan også brukes til å diagnostisere subakutte IA hos ikke-nøytropene og pasienter med CGD. Hos høyrisikopasienter med akutt IA finnes økte mengder aspergilluspesifikke antistoffer kun hos 1/3 av pasientene. (31)

1.7.3. Nukleinsyretester

Det er besnærende å bruke DNA fra soppen som et surrogatmål. Enkelte gener hos sopp er svært godt konserverte og er felles for de fleste arter, sk panfungale mål. Samtidig har alle arter sine egne spesifikke sekvenser som vil kunne gi en spesifisitet på 100 %. Men selv om PCR-teknologien har gjort formidable fremskritt mht tid og kostnader, er metoden fremdels heftet med en del utfordringer.

DNA

Målmolekylet – soppens DNA – finnes for det meste intracellulært, og for å starte amplifikasjonsreaksjonen må en først klare å ekstrahere DNAet på en rask og effektiv måte. Ulike testlaboratorier har ofte brukt sine egne metoder og det har vært tilgjengelig nokså få kommersielle sett. For å kunne fjerne menneskelige variable må det helst benyttes automatiserte teknikker, f.eks sentrifugering med små glasskuler.

Når det gjelder kinettiken til soppens DNA viser foreløpige undersøkelser (36) at det øker og minker i motsatt retning av GM og DG. Det vi si at mengden av soppens arvestoff i blod er størst når soppveksten stopper opp og når hyfene går i oppløsning, f.eks som følge av lite næring eller antimykotisk terapi. Slik kan faktisk antimykotika øke PCR-testenes sensitivitet.

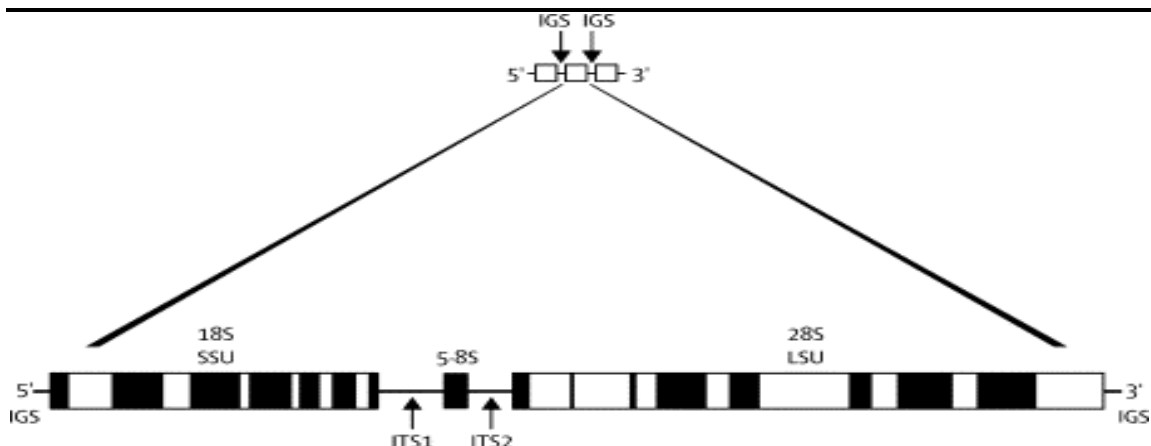
Primer-mål

Ved mistanke av invasiv mykose vil en tilnærming der man starter med bredspektrede, panfungale sekvenser og foretar artbestemmelsen etter en eventuelt vellykket amplifisering, være en formålstjenlig strategi. Et hittil mye brukt mål har vært ribosomalt DNA (rDNA) – se figur 1.2. _

Dette har flere fordeler:

- generelt godt konserverte gensekvenser som er felles for mange sopparter
- inneholder også en god del variable områder
- det foreligger mye artsspesifikke data
- flerfoldige kopier (i gjennomsnitt 12) i hvert fullstendig genom

Figure 1.2 Strukturen til ribosomalt DNA. Mørke felt markerer variable områder. IGS - intergenic spacer; ITS - internal transcribed spacer; LSU - long subunit; SSU=short subunit (fra (31))



Det har også vært brukt mitokondrielle DNA-sekvenser for tRNA og apocytokrom b. Se eksempler på primer mål i Tabell 1.8.

Tabell 1.8 Eksempler på primer-mål for *Aspergillus* PCR (fra (31)).

Primer target	Assay format	Intended specificity	BLAST search of primer and probe sequences; isolates with same probability match as intended target	Method by which analytical specificity determined and result
18S rRNA	PCR-ELISA	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Penicillium italicum</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium phialosporum</i> , <i>Penicillium tardum</i> , <i>Penicillium allii</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Ajellomyces capsulatus</i> (telemorph of <i>Histoplasma capsulatum</i>), <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Eupenicillium</i> spp, <i>Penicillium</i> spp	Cross-reactivity studies: Amplification of <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> No amplification of <i>Malassezia furfur</i> (3 strains), <i>Fusarium</i> spp (3 strains), <i>Trichosporon cutaneum</i> (2 strains), <i>Mucor</i> spp (3 strains), <i>Penicillium</i> spp (2 strains), <i>Pseudallescheria boydii</i> (1 strain), <i>Paecilomyces</i> spp (2 strains), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2 strains)
18S rRNA	TaqMan	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Aspergillus</i> spp, <i>P italicum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>P commune</i> , <i>P chrysogenum</i> , <i>P brevicompactum</i> , <i>P phialosporum</i> , <i>Penicillium purpogenum</i> , <i>P tardum</i> , <i>Penicillium verruculosum</i> , <i>Penicillium hirsutum</i> , <i>Penicillium radicum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Penicillium siamense</i> , <i>Penicillium pittii</i> , <i>Penicillium minioluteum</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Penicillium variabile</i> , <i>Penicillium rugulosum</i> , <i>Penicillium crateriforme</i> , <i>Penicillium variotii</i> , <i>Eupenicillium</i> spp, and others	Cross-reactivity studies: Amplification of <i>A fumigatus</i> , <i>A niger</i> , <i>A terreus</i> , <i>A flavus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> No amplification of <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida guilliermondii</i>
Mitochondrial DNA (tRNA)	Competitive PCR with PCR-ELISA	<i>Aspergillus</i> spp	<i>A fumigatus</i>	Cross-reactivity studies: Amplification of 30 isolates of <i>A fumigatus</i> , <i>A niger</i> , <i>A terreus</i> , <i>A flavus</i> No amplification of <i>A nidulans</i> , <i>C albicans</i> , <i>C tropicalis</i> , <i>C krusei</i> , <i>C parapsilosis</i> , <i>C glabrata</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>
Mitochondrial DNA (tRNA)	Competitive PCR with PCR-ELISA	<i>A fumigatus</i> , <i>A flavus</i>	No database matches	Amplicon sequenced: revealing <i>A fumigatus</i> and <i>A flavus</i> Cross-reactivity studies: No amplification of <i>A niger</i> , <i>A terreus</i> , <i>A nidulans</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Penicillium purpogenum</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
Mitochondrial DNA (tRNA)	LightCycler	<i>A fumigatus</i>	<i>A fumigatus</i>	None, although clinical specificity assessed using 20 serum samples from healthy individuals
Mitochondrial DNA (cytochrome b)	LightCycler	<i>A fumigatus</i>	<i>Eupenicillium shearii</i> , <i>Neosartorya fischerii</i> , <i>A fumigatus</i>	Cross-reactivity studies: Amplification of <i>A fumigatus</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> No amplification of <i>Candida</i> spp, other <i>Aspergillus</i> spp, <i>P chrysogenum</i> , <i>P expansum</i> , <i>P funiculosum</i> , <i>P variotii</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>

Selve amplifisering

For å optimalisere den analytiske sensitiviteten har det blitt brukt mye *nested PCR* – teknikk. Men dette krever åpning av reaksjonsbrønnene og innebærer dermed en viss risiko for kontaminering og falsk positive svar. En mer dynamisk amplifikasjonsteknikk – real time PCR (rtPCR) kan i en viss grad avhjelpe kontaminasjonsproblematikken på laboratoriet.

Sensitivitet

Generelt kan man diskutere hvordan man skal bestemme kvantifisering av DNA i prøvematerialet. Det har vært problemer med å gjennomføre større sammenlignende studier pga ulike metoder for DNA-ekstraksjon og teknikker for amplifisering. Noe

annet som også har vist seg å svekke sensitiviteten, er faktumet at den aktuelle pasientgruppen ofte får flere medisiner og intravenøse væskeløsninger pga sin underliggende sykdom og tilstand. Disse kan av og til interferere med PCR-reaksjonen. Det bør derfor alltid foretas inhibisjonskontroller parallelt med selve PCRen.

Spesifisitet

Den kan teoretisk bli 100%. Denne baserer seg på DNA-sekvenser som er unike for den aktuelle sopparten (se også Tabell 1.9). Dog kan det tenkes en teoretisk mulighet for at det kan finnes levende organismer, hvis genom ennå ikke er fullstendig kartlagt og som har identiske gensekvenser.

Tabell 1.9 Aspergillus-PCR av renkulturer og deres spesifisitet (fra (31))

Specimen	Target	Demonstrated specificity	PCR format	Detection method
Cultures	ITS1-5.8S rRNA-ITS2	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ustus</i>	Conventional	Sequencing of amplicon
Cultures	ITS1-5.8S rRNA-ITS2	<i>A fumigatus</i> , <i>A flavus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus versicolor</i>	Conventional	Line probe
Cultures	ITS1-5.8S rRNA-ITS2	<i>A fumigatus</i> , <i>A flavus</i> , <i>A terreus</i> , <i>A niger</i> , <i>A nidulans</i>	Conventional	SSCP
Cultures	ITS1-5.8S rRNA-ITS2	<i>A fumigatus</i>	Multiplex PCR	Ethidium bromide
Cultures	ITS1-5.8S rRNA-ITS2	<i>A fumigatus</i>	Nested	Ethidium bromide
Cultures	5.8S rRNA-ITS2 region	<i>A fumigatus</i> , <i>A flavus</i> , <i>A terreus</i> , <i>A niger</i>	Conventional	Automated fluorescent capillary electrophoresis (detection of different length of amplicon)
Cultures	18S rRNA	<i>A fumigatus</i> , <i>A terreus</i>	Conventional	SSCP
Cultures and tissue	ITS2	<i>Aspergillus</i> spp and <i>Penicillium</i> spp, <i>A fumigatus</i> , <i>A flavus</i> , <i>A terreus</i> , <i>A niger</i> , <i>A nidulans</i> , <i>A ustus</i> , <i>A versicolor</i>	Conventional	PCR-ELISA

I utgangspunktet kan PCR-teknikken appliseres til et vidt spekter av prøvemateriale – blodfraksjoner (serum, plasma og fullblod), BAL-væske, CSF og vevsprøver (inklusive parafinsnitt). Det vanligste i klinikken er bruken av blod og BAL, begge med nokså lik sensitivitet (se Tabell 1.10) Det er pasientens sykdomsbilde og tilstand som bør bli avgjørende for valg av prøvemateriale. Spesielle hensyn ved bruk av de ulike prøvene vil jeg diskutere senere.

Tabell 1.10 Oversikt over de ulike prøvenes sensitivitet og spesifisitet.

Prøvemateriale	Sensitivitet	Spesifisitet	Kilde
Blod	0.88	0.75	(51)*
1 pos prøve	[95%CI:0.75-0.94]	[95%CI:0.63-0.84]	
2 pos prøve	0.75 [95%CI:0.54-0.88]	0.87 [95%CI:0.78-0.93]	
BAL	0.79	0.94	(52)
	Konfidensintervall ikke angitt		
LRpos=10.41 [95%CI: 6.40-16.95]		LRneg=0.22 [95%CI: 0.14-0.36]	

* Forfatterens konklusjon: Det kreves 2 etterfølgende positive prøver for å bekrefte diagnosen IA, men det holder med 1 negativt svar for å ekskludere diagnosen.

Hos høyrisikopasienter vil testeffektiviteten være enda høyere. I en prospektiv studie i Madrid ble 83 febrile neutropene pasienter (med prevalens ved studieperiodens slutt av IA på 14.4%) screenet med kvalitativ rtPCR for Aspergillus-DNA.(53) Med krav om 2 påfølgende positive prøvesvar, fant de

Sensitivitet: 91.6%; spesifisitet: 94.4%; PPV: 73.3%; NPV: 98.5%. Og når de kombinerte PCR-svar med GM-testingen, økte de sensitiviteten til 100% med PPV:75.1%.

I tillegg ble PCR positiv i gjennomsnitt 21 dager før man kunne se forandringer på HRCT og 68 dager før GM viste positivt svar.

Konsensus

Helt siden 1990-årene har man prøvd å diagnostisere soppinfeksjoner ved hjelp av påvisning av soppspesifikke nukleinsyresekvenser. Lenge ble slike PCR-baserte metoder regnet som eksperimentelle, og pga manglende standardisering har det vært vanskelig å vurdere og sammenligne deres effektivitet i diagnostikken av IA. De senere årene har det dog kommet enkelte oversiktsartikler med metaanalyser. På et møte i International Society for Human and Animal Mycoses (ISHAM) i Paris ble det i September 2006 grunnlagt et fellesprosjekt - the European Aspergillus PCR Initiative. Samarbeidet omfatter over 69 laboratorier, sykehus og forskningssentre fra 24 land i Europa, Midt-Østen og i Australia. (33) Målet for samarbeidet er å komme frem til en felles standard for PCR-basert test for IA som EORTC da kan inkludere i konsensusdefinisjonen for invasive mykoser.

Den foreløpige anbefalingen for PCR-metoden er som følger:

Gjelder EDTA-fullblod

1	Minste blodvolum 3 ml.
2	Lysering av soppceller skal skje vha små glasskuler.
3	rtPCR av multi copy gener og med arts- eller slektsspesifikke prober..
4	Alle prøver dupliseres. Ved diskrepans ny rtPCR på identisk ekstrakt.
5	En kontroll-PCR av ikke-humant materiale.
6	En negativ kontroll for ekstraksjon av DNA og kjøring av PCR.
7	Fortynningsvolum <100 µl.
8	Kun EDTA brukes, ikke citrat eller heparin.
9	Alle partier av reagenser bør screenes for mulig forurensning.

1.7.4. Ulike prøvematerialer

Vevsprøver fra sterile compartments

Dyrkning og histologi, ikke sjelden gjort *post mortem*, er fremdeles gullstandard.

Styrker: Påvisning av soppelementer ved dyrkning eller DNA vil alltid være signifikant og angi diagnosen.

Svakheter: Dyrkning har lav sensitivitet. Selv ved tydelige og typiske histologiske tegn er dyrkning positiv kun i 30-50 % av tilfellene. (54)

Uthenting av prøvemateriale ved biopsi, FNAC e.l. forutsetter invasive prosedyrer.

Vevsprøver fra ikke-sterile compartments

Ved diagnose av invasiv aspergillose må prøvemateriale fra øvre- og nedre luftveier, deriblant BAL regnes som surrogatprøvemateriale. Men når man vet at så godt som alle invasive infeksjoner starter med slimhinnekolonisering/ -infeksjon med *Aspergillus*-konidier, kan man legitimere denne tilnærmingen. Dog er positiv dyrkning av *Aspergillus* fra ikke-sterile kroppsrom som regel ikke forbundet med sykdom hos pasienten. (11) Påvisning av *Aspergillus* i luftveier kan bety flere ting – bevis for infeksjon, eller tegn på kolonisering eller markør for kolonisering som et ledd i fremtidig utvikling av IA. Slik kan positiv dyrkning også oppfattes som et svært tidlig tegn på IA med mulighet for forebyggende behandling.(55)

Styrker:

Prøvematerialet kan brukes til både cytologi, dyrkning, samt påvisning av GM og PCR. rtPCR gir god sensitivitet hos neutropene pasienter og viser *funga* *burden* som er viktig med tanke på prognose og monitorering av behandling.

Svakheter:

Selv om bronkoskopi med BAL er en relativt trygg prosedyre, er de aktuelle pasientene ofte svært dårlige i utgangspunktet, og det må overveies nødvendigheten for å utsette dem for flere prosedyrer.

Generelt lav sensitivitet (rundt 50%) for dyrkning og histologi. Resultatet er avhengig av teknikk, lesjonssted og –størrelse og når bronkoskopi gjennomføres.

Blod

Det er per dags dato ikke noen klare bevis for hvilken del av blod – serum, plasma eller fullblod – som er den optimale for PCR. Det er heller ikke blitt etablert konsensus for når og hvor ofte man skal screene eller hvordan følge utviklingen med blodprøver.

Srtyrker:

Svært tilgjengelig og ikke-invasiv metode.

Ved kombinerings av PCR med serologiske markører som GM og DG, øker sensitiviteten og NPV.

PCR, GM og DG er tidlige markører for IA, og PCR og GM er svært spesifikke.

Konsentrasjonen av GM og PCR har også prognostisk verdi.

Svakheter:

Blodkultur er sjelden positiv selv ved utbredt og disseminert IA.

Kinetikken til surrogatmarkørene i blod er ikke fullstendig kartlagt *in vivo*.

Tolkningen av PCR og GM er avhengig av prevalens.

1.7.5. Radiologi

Radiologi har vært et svært viktig supplement i diagnostiseringen av IA. Radiologiske funn har vært inkludert i kriteriene for diagnostisering av invasive mykoser helt fra den første versjonen av konsensusretningslinjene. I prinsippet kan enkel røntgen thorax vise de samme forandringene som HRCT. Konvensjonell røntgen gir mye svakere stråledose og kan gjentas uten betenkeligheter. Men med utviklingen av både røntgenmaskiner og programvare har HRCT blitt helt overlegen i sin sensitivitet. For påvisning av disseminert IA og lokale abscesser i f.eks lever, milt, bihulene og i kraniet, er både CT og MR gode metoder.

I sin patogenese har *Aspergillus*hyfene en tendens til å invadere blodårer. Invasjonen kan føre både til disseminering og til lokale inflammatoriske prosesser med påfølgende trombose, iskemi, vevsinfarkt, blødninger i vev og i alveolene og senere nekrose. Disse

typiske og karakteristiske tegn, som dog ikke er eksklusive for Aspergillusinfeksjoner, er det man ser etter på radiologiske bilder.

- Røntgentette noduli – ofte et tidlig tegn.
- Segment- og lobulusformede konsolideringer
- Pyramideformede infarkter (figur 1.3a)
- Pleuraeffusjon
- Halo tegn. (figur 1.3b) Som et ledd i IPA dannes det ofte eksudatødem og det foregår trombosering og blødning parallelt pga progredierende invasiv vekst av av hyfene. Dette gir et annet typisk tegn, sk halo – makronodulus omringet av et perimeter av mattglassaktig radietetthet. (6) I enkelte studier har over 70% av voksne pasienter med IPA hatt synlige halo tegn på CT. (56)
- Kavitetsformasjoner, med eller uten nekrotisk kjerne – gir karakteristisk air crescent tegn. (figur 1.3c) Kaviteten kommer ekstra godt til syne pga infiltrasjon av vevet rundt kaviteten.

Styrker: Rask og ikke-invasiv.

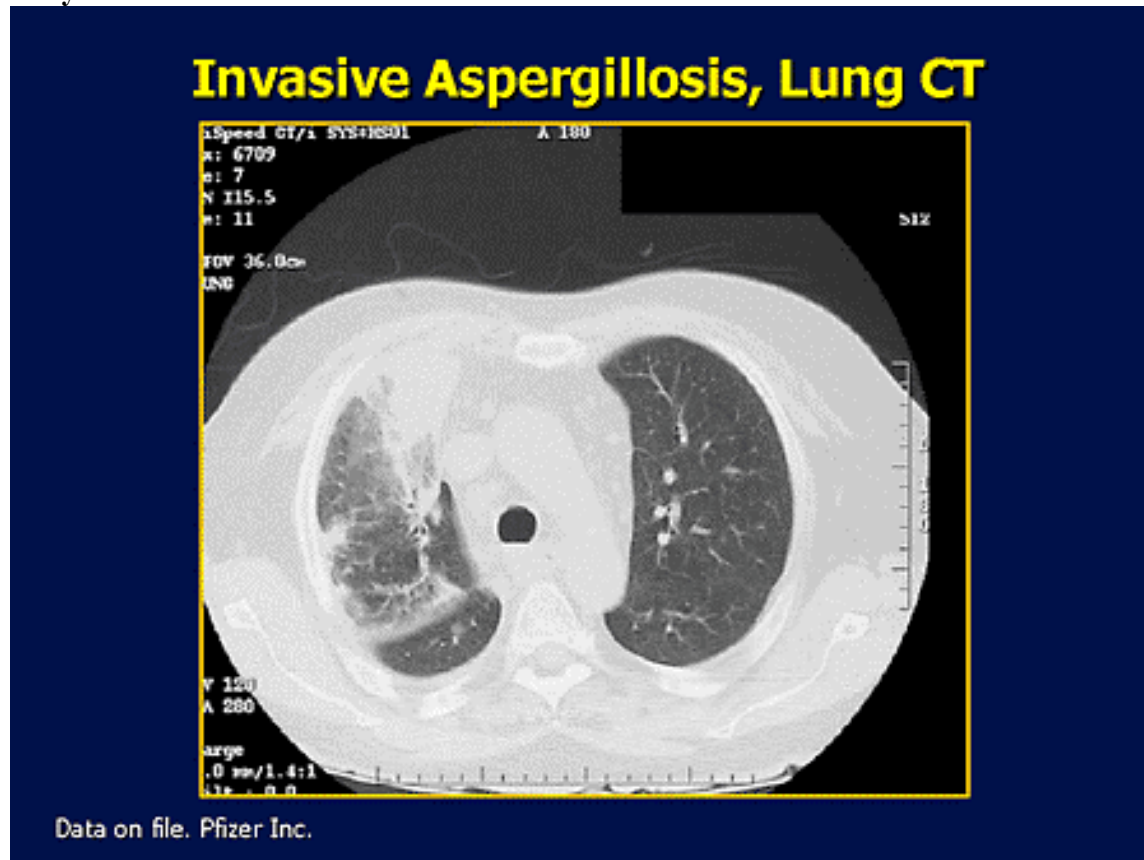
Svakheter: Ikke spesifikk. Ingen definitiv identifikasjon av etiologisk agens. Lignende radiologiske forandringer kan tilskrives andre patogene agens, som f.eks Pseudomonas. Halo- og air crescent-tegn er også nokså flyktige og kan av og til forveksles med medfødte kar-anomalier, cyste og artefakter pga respirasjon. (56)

Utviklingen av radiologiske forandringer kan også mangle eller komme relativt sent i forløpet av IA hos neutropene pasienter.

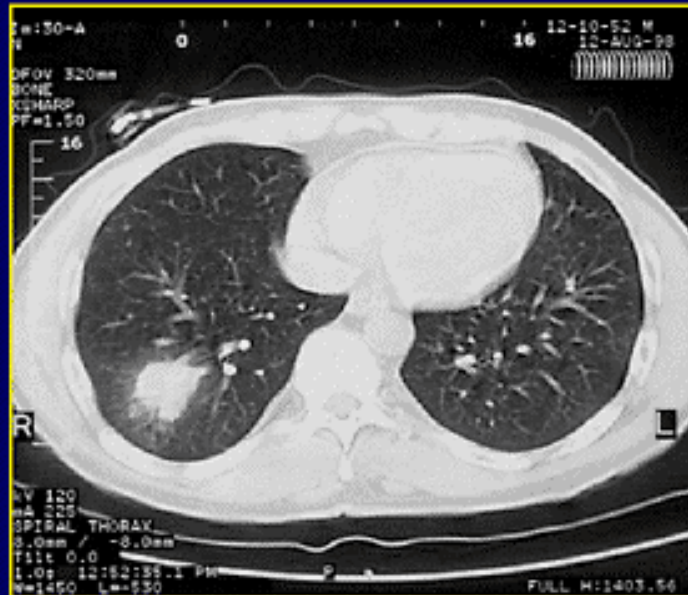
-CT utsetter pasienten for relativt høy strålebelastning.

Figur 1.3A-C Karakteristiske radiologiske funn ved pulmonal aspergillose (fra (57)).

A Pyramideformet infarkt

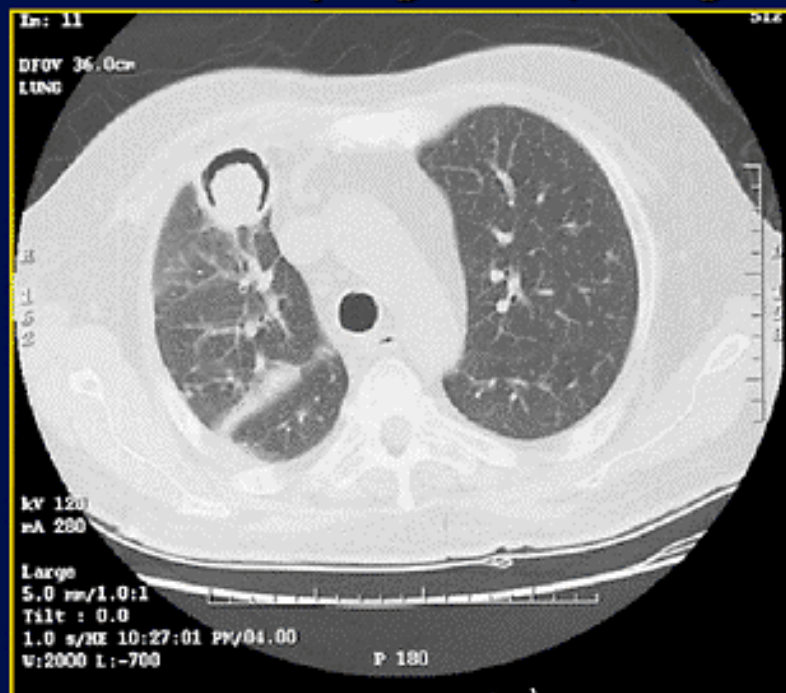


"Halo" Sign on CT of Neutropenic Patient With Aspergillosis



Data on file. Pfizer Inc.

Invasive Aspergillosis, Lung CT

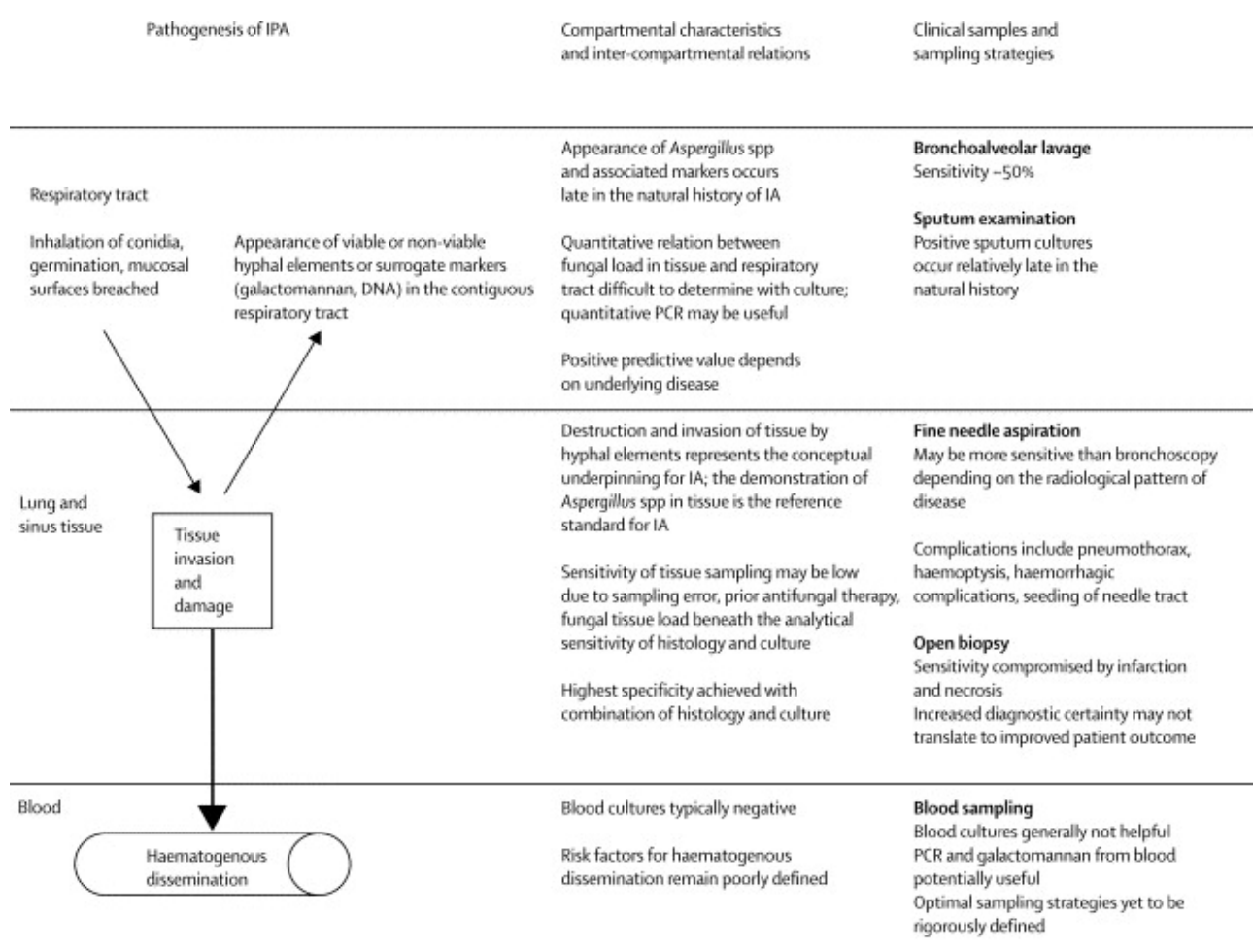


Data on file. Pfizer Inc.

1.7.6. Integrert bruk av metoder

Diagnose av IA er ikke enkelt. Gullstandarden – histologi + dyrkning – er langsam, krever invasive teknikker og ikke spesielt sensitiv. Dessuten blir diagnosen ofte dessverre først bekreftet ved autopsi. Utviklingen av mange metoder gjennom tidene tyder også på at ingen av disse er god nok, i hvert fall ikke alene. En fornuftig bruk av en kombinasjon av disse vil øke både sensitiviteten og spesifisiteten. I en oversiktsartikkel publisert 2005 i *Lancet Infectious Diseases* (31) sammenfattes den karakteristiske patogenesen og mulige fleksible og integrerte prøvetakingsanbefalinger ved truende IA i form av en illustrerende flytdiagram – se Figur 1.4.

Figur 1.4 Oversikt over patogenese og forslag til diagnostisk fremgangsmåte ved mistanke om aspergillose (fra (31)).



EORTC/MSG har i sitt samarbeid om å etablere felles definisjoner for invasive mykoser kommet frem til en definisjon som opererer med 3 ulike grader av sannsynlighet for en slik invasiv infeksjon - *sikker*, *sannsynlig* og *mulig*.

Diagnostiske kriterier for invasiv aspergillose (IA) oversatt og adaptert fra (42)

(1) Sikker IA – ett av følgende kriterier

- ⇒ Histopatologisk, cytopatologisk eller direkte mikroskopi av prøvemateriale fra FNA eller biopsi hvor det sees hyfer samt karakteristisk vevsskade.
- ⇒ Positiv dyrkning av prøvemateriale hentet ved sterile teknikker fra sterile kroppsrør som er klinisk eller radiologisk patologiske (eksklusive BAL, prøver fra bihulene og urin).

(2) Sannsynlig IA – krever én vertsfaktor, samt ett klinisk og ett mykologisk kriterium

(3) Mulig IA – fyller kravene om klinikk og vertsfaktorer, men mangler mykologisk støtte

A Vertsfaktorer

- ⇒ Nylig periode med neutropeni ($<0.5 \times 10^9/L$) med varighet over 10 dager og som sammenfaller tidsmessig med starten av infeksjonen.
- ⇒ Mottakere av allogen HSCT.
- ⇒ Langvarig bruk av kortikosteroider (eksklusive pasienter med ABPA) med doser på minst 0.3 mg/kg/dag eller Prednisolon som tilsvarer 3 ukers behandling.
- ⇒ Behandling med andre kjente T-cellehemmende midler som ciklosporin, TNF- α blokkere, spesifikke monoklonale antistoffer eller nukleosidanaloger siste 90 døgner.
- ⇒ Medfødt alvorlig immunsvikt (f.eks CGD eller SCID).

B Kliniske kriterier:

- ⇒ Nedre luftveisinfeksjon (dvs ett av tre tegn på CT)
 - tette, klart avgrensede lesjoner med eller uten halo-tegn
 - air-crescent tegn
 - kavitetsformasjoner
- ⇒ Trakeobronkitt: sårdannelse i nedre luftveier, noduli, pseudomembraner, plakk eller skorper og arr som er synlige ved bronkoskopi.
- ⇒ Akutt sinusitt (radiologi + ett av tre symptomer)
 - akutt lokalisert smerte over bihulene
 - sårdannelse og skorper i nesen
 - spredning fra paranasale sinus over benbarrierer inklusive orbita
- ⇒ Infeksjon i CNS (ett av tegnene)
 - fokale lesjoner på radiologiske bilder
 - oppladning av hjernebinnene på MR eller CT

C Mykologiske kriterier:

- ⇒ Direkte test (cytologi, direkte mikroskopi eller positiv dyrkning).
Direkte mikroskopi av sputum, BAL, bronkial børsting og sinusaspirater for muggsopp som vil være indisert ved tilstedeværelse av soppmyser eller positiv dyrkning fra prøven.
- ⇒ Indirekte tester (påvisning av celleveggantigen eller komponenter av celleveggen)
Måling av Aspergillus-antigenet GM i plasma, serum, BAL eller CSF.

Konsensuskriteriene er ment som et hjelpemiddel til å kunne standardisere pasientpopulasjoner i ulike kliniske studier slik at det skal bl.a være mulig å sammenligne og vurdere effekten av ulike tiltak. Selv om man ikke fyller kriteriene for invasiv mykose, betyr det ikke at pasienten ikke har en slik invasiv infeksjon. Sopp og kropp kan oppføre seg atypisk. Det er fortsatt det kliniske bildet og en helhetlig vurdering som skal styre diagnostiseringen og valg av terapi i praktisk klinisk arbeid.

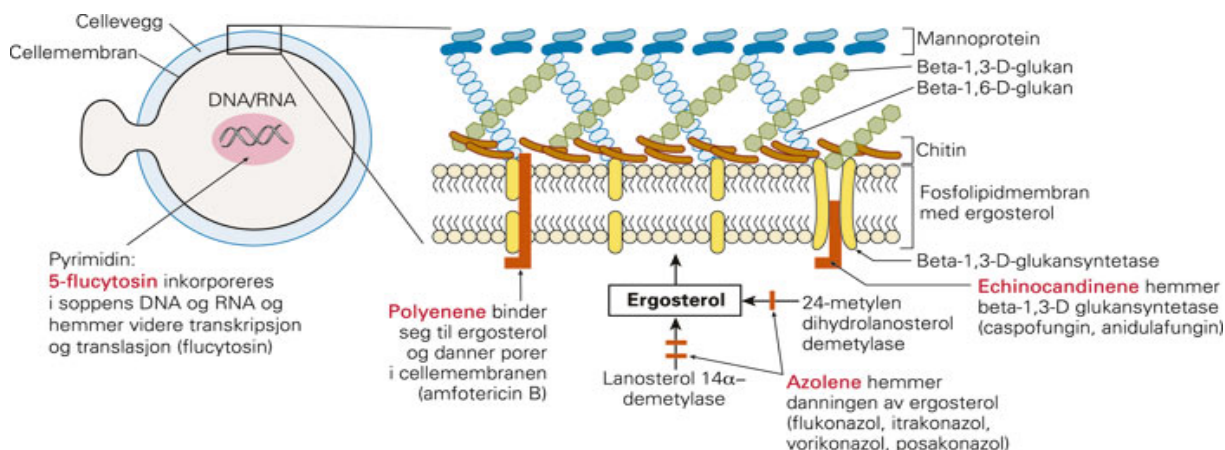
1.8. *Behandling av aspergillose*

Selv om prevalensen av IA som andel risikopasienter som får en slik invasiv mykose ikke øker (4), er det absolutte tallet av pasienter med sikker eller sannsynlig IA økende i takt med økende antall pasienter som får immunsuppresiv terapi av ulike årsaker – transplanterte, pasienter autoimmune sykdommer og pasienter med hematologiske sykdommer. I tillegg (over)lever pasientene i høyrisikogrupper lenger takket være mer effektiv behandling for sin grunnsykdom. Også overlevelsen av IA har blitt signifikant bedre. Dette kan tilskrives delvis tidligere diagnose som fører til tidligere behandling, og delvis bedre, dvs sikrere og mer effektiv antimykotisk behandling.(58) Likevel er prognosen fremdeles dyster ved akutte fulminante tilfeller av IA. Ifølge studiene vil opptil 80 % av pasientene ikke overleve en invasiv muggsoppinfeksjon. Tidlig diagnose og behandling er assosiert med bedre behandlingseffekt og økt overlevelse.(59) Pga uspesifikke kliniske tegn og funn, lite sensitiv dyrkning, krav om bruk av invasive metoder for uthenting av prøver og usikre biokjemiske og molekylære markører utsettes mange pasienter får empirisk behandling, dvs man starter behandlingen på klinisk mistanke før man har etablert diagnosen IA. Empirisk behandling fører uten tvil med seg overbehandling der pasienter får uriktig eller unødvendig behandling med svært potente midler som både kan være toksiske, organskadelige og interferere med annen behandling. Ikke minst er medisinene i bruk også ofte dyre. Det foreligger enkelte studier der man sammenligner empirisk behandling med diagnosebasert strategi, hvor det siste alternativet har blitt påvist å føre til redusert bruk av antimykotika uten økt risiko for prognosetap. (28)

1.8.1. Antimykotika

I utviklingen av antimykotiske medisiner har man fulgt samme prinsipp som i utviklingen av antibiotika, dvs man har prøvd å designe midler som angriper elementer hos soppen uten å skade humane celler. Sopp er eukaryote organismer som har en DNA-holdig kjerne og organeller som de i humane celler. Men det er selvsagt også enkelte viktige forskjeller. F.eks inneholder soppens cellevegg ergosterol (mot humant kolesterol) og β -1,3-D-glukan, som humane celler mangler. De fleste antimykotika retter seg nettopp mot produksjon og integritet av ulike bestanddeler i soppens cellevegg (se også figur 1.5). Per dags dato finnes det tre klasser av medikamenter for behandling av IA – polyenene, azolene og echinokandinene.(60) Det har også blitt utviklet en nukleosidanalogue, 5-flucytosin, som hemmer syntese av DNA og RNA i soppens cellekjerne. Medikamentet brukes i Norge på registreringsfritak kun mot kryptokokkinfeksjoner.

Figur 1.5 Virkningen av ulike antimykotika, her illustrert ved utsnitt av celleveggen til en gjærsopp (fra (30))



Polyenene

Stoffet Amfotericin B binder seg til sterolene i soppens cellevegg og fører til økt permeabilitet i den. Midlet kan føre til poredannelse og lekkasje av intracellulære ioner og metabolitter. Avhengig av konsentrasjonen virker Amfotericin B fungistatisk eller fungicid.

Amfotericin B er ikke helt selektiv for ergosterol. Midlet fester seg i en viss grad også til humane steroler og virker dermed toksisk på infusjonsstedet og i nyrene. Nyere formuleringer i lipidkapsler (liposomal form) eller i lipidkomplekser unngår i større grad nyrene og er tryggere i så måte. Dette tillater også doseringer mot høyere serumkonsentrasjoner.

Styrker: Midlet er bredspektret - virker mot de fleste stammene av *Candida*, *Aspergillus* og Kryptokokker med MIC ≤ 1 mg/l.

Svakheter: Eldre formuleringer er nyretoksiske. Nyere lipidformuleringer er svært dyre. Kun intravenøs administrering.

Azolene

Azolene – imidazol-/triazolderivatene – binder og hemmer enzymer involvert i ulike trinn av dannelsen av ergosterol. Celleveggen blir defekt og soppen vil lysere. Midlene har begrenset antimykotisk spektrum. Resistens og kryssresistens forekommer.

Styrker: Tolereres godt. Tillater også peroral administrering.

Svakheter: Midlene metaboliseres i leveren av CYP3A4-enzymene. Doseringen av andre medisiner som metaboliseres av samme enzymer må justeres og kontrolleres. Resistens forekommer.

I Norge er det kun to midler i denne gruppen godkjent som behandling mot IA - Voriconazol og Pozakonazol. I tillegg brukes Itraconazol i USA.(6) Midlet har også vist å være effektiv ved ABPA.(2)

Echinocandinene

Den siste gruppen midler – echinokandinene - binder til enzymer i celleveggen og hemmer syntese av β-1,3-D-glukan – en viktig bestanddel av soppens ytre membran. Soppcelleveggen fornyes ikke og cellen blir høyosmotisk. Som en tilleggsegenskap er det blitt registrert en slags synergi mellom Caspofungins virkning på soppen og vertens immunforsvar. Candinene kan indusere morfologiske forandringer i aspergillusshyfer

som øker sitt uttrykk av β -glukaner. Dette forsterker aktivisering av makrofager og granulocytter via binding til dectin-1-reseptorer hos disse. (28) Av de tre norske registrerte candidinene er det Caspofungin og Anidulafungin (ikke med i Legemiddelhandboka) som kan brukes mot IA og den har da fungistatisk effekt overfor soppen.

Styrke: Bredspektret. Ikke nyretoksisk.

Svakheter: Fungistatisk overfor Aspergillus. Kun langsam intravenøs administrering.

Interaksjon med immunmodulerende midler som Tacrolimus og Ciklosporin.

Resistens

Det forekommer svært sjelden resistens. Dette gjelder både naturlig (primær) og ervervet (sekundær) resistens *in vitro*. (28, 30) Vi vet at *Aspergillus terreus* er naturlig resistent mot Amfotericin. (6, 61) Det har blitt observert resistens hos *Aspergillus fumigatus* mot Itraconazole ved langvarig behandling av pasienter med kroniske aspergillose (aspergillom og ABPA). Disse stammene var også mindre sensitive overfor Posaconazol (kryssresistens). (6, 28, 30) Det har også beskrevet flere stammer hos *Aspergillus fumigatus* i Nederland som var resistente mot alle azolpreparatene, inklusive Voriconazol. (28, 61, 62) Det har også blitt funnet enkelte caspofunginresistente stammer av *Aspergillus fumigatus*. (28)

På tross av bevist fungistatisk og fungicid effekt *in vitro*, er behandlingen av IA ikke alltid effektiv *in vivo*. Dette kalles klinisk resistens. Fenomenet opptrer hos pasienter med alvorlige immundefekter der spesielt neutrofilfunksjonen, kvalitativt eller kvantitativt, er sterkt kompromittert. Som tidligere diskutert under patogenese, er det, uansett hvor effektiv eller sterk kjemoterapi man gir mot sopp, helt avgjørende med bidrag fra makrofager og neutrofile granulocytter for eliminering av sporer og hyfer. Mange tilfeller av kroniske aspergillose – aspergillom og ABPA – vil også kunne regnes som i stor grad klinisk resistente.

1.8.2. Adjuvant terapi

Reversering av immunsuppresjon

Ved bekjempelse av IA er vertens immunforsvarsceller helt nødvendige. Antimykotika vil aldri kunne gjøre jobben alene. Derfor bør det å øke antallet og effektiviteten til disse cellene være ett av målene i terapiregimet ved IA. Ved mistanke om eller forventning av en invasiv mykose skal man alltid vurdere muligheten for reversering av immunsuppresjonen.

Mulige måter å gjøre det på er

- nedtrapping/ seponering av immunsuppressiv terapi
- administrering av benmargstimulerende faktorer som G-CSF og GM-CSF
- granulocyttransfusjoner
- rekombinant INF- γ

1.8.3. Kirurgi

Kirurgi er et viktig supplement ved behandling av aspergillomer, abscesser og sinusitter i form av fjerning av nekrotisk vev, sinusdrenasje og evakuering av ekstrapulmonale abscesser. Som all annen behandling er adjuvant terapi forbundet med risiko og bivirkninger som må nøye vurderes opp mot ønsket effekt. Reduksjon av iatrogen immunsuppresjon kan føre til oppblussing av pasientens autoimmune grunnsykdom, avstøtningsreaksjoner hos transplanterte eller tilbakefall av leukemi.

Granulocyttransfusjoner og behandling med kolonistimulatoren har blitt vist til å kunne føre til ARDS under transfusjonen. (41) Det forbedrede immunforsvaret kan i tillegg føre til lokal forverring i infeksjonsfoci i lungene i form av rask nedbrytning av den inflammatoriske kapselen og blødning i alveolene. (6) Og selv om slik behandling beviselig fører til økt antall sirkulerende granulocytter og *in vitro* studier viser god effekt mot *Aspergillus*-hyfer, er det foreløpig ikke nok bevis for å kunne anbefale slike midler rutinemessig. (41)

1.8.4. Profylakse og forebyggende tiltak

Når man vet at hos en del høyrisikopasienter er det relativt høy forekomst av aspergillose, og at utgangen ikke sjelden er fatal, er det svært interessant å kunne forebygge infeksjoner med muggsopp og utviklingen av invasive mykoser. Man kan tenke seg to typer forebyggende tiltak – miljømessige tiltak rundt pasienten som ikke er invasive, og profylaktisk medisinerings som jo kan medføre unødvendig fare for pasienter i form av bivirkninger.

Fysiske tiltak

BestPractice viser til flere retningslinjer der det anbefales bruk av høy-effektiv partikkelfiltrering (HEPA) og *positiv air pressure*-ventilering på sykehusavdelinger med høyrisikopasienter for å redusere graden av eksponeringen for soppsporer og andre luftbårne mikrober. Det er flere studier som setter utbrudd av IA i sammenheng med byggeaktiviteter, renovasjonsarbeid og grunnarbeid i og ved sykehus. (63) Samtidig er det ikke sikkert om antall konidier i luften automatisk korrelerer med antall infeksjoner. (64) Også her til lands er synspunktene delte. På den ene siden ble det nylig registrert tre tilfeller av pulmonal soppinfeksjon, med antakelig *Aspergillus*, på hematologisk avdeling ved St Olavs Hospital der man noen få uker tidligere hadde drevet med omfattende byggevirksomhet og nedrivning av en høyblokk. (65) Helsetilsynet ble varslet, og sykehuset satte i gang intensivt kontroll og utskifting av filtre i ventilasjonsanlegg, skrudde opp viftehastigheten, økte hyppigheten på renhold både utvendig og innvendig, forsegle vinduene ved avdelingen og gjennomførte hyppigere målinger av støvinnholdet i luften. På den annen side ble det i en studie gjennomført 1998-1999 ved Rikshospitalet i Oslo (12) ikke funnet noen effekt av luftrensingstiltak som HEPA-filtrering eller *laminar flow* ventilering på insidensen av IA. Dessuten viste genetisk undersøkelse at stammene som forårsaket IA på Rikshospitalet ikke var de som ble isolert i sykehusluften. Forurensningskilden ble funnet å være den overfladiske drikkevannskilden i Oslo. Hypotesen om vannbåren smitte i form av aspergilluskonidier som aerosoliseres ved vannkildene, støttes i flere undersøkelser. (66) Det anbefales tiltak som rengjøring av sykehusets vannforsyningssystemer og dusjene på avdelinger. Man kan stille spørsmål ved slike tiltak når den standardrensingen av drikkevann i Oslo ikke klarte å fjerne sporene av *Aspergillus* og at det ikke er sammenheng mellom antall konidier man blir eksponert

for. Det blitt sett at konsentrasjoner så lave som 1 CFU/ m³ er nok til å starte en infeksjon som utvikler seg til IA. (63)

Medikamentell profylakse

De British Medical Journal-baserte kliniske guidelines BestPractice(26) anbefaler profylaktisk medisinerings hos to pasientgrupper. Pozakonazol ble anbefalt hos pasienter med AML under induksjonskuren og ved GVHD etter stamcelletransplantasjon. (Evidens A) Samt Itrakonazol i tillegg til INF- γ hos pasienter med CGD. For andre pasienter, uansett risikoprofil, har de ikke funnet noen grunnlag for preventiv medisinerings.

Til sammenligning er guidelines i UpToDate (41) noe mer tilbakeholdne. Selv om de viser til en meta-analyse der antimykotisk profylakse reduserte soppassosiert sykdom (RR 0.33; 95% CI, 0.18-0.63) og invasive mykoser (RR 0.52; 95% CI, 0.27-0.99) hos pasienter med akutt leukemia, og samtidig senket dødelighet hos stamcelletransplanterte (RR 0.62; 95% CI, 0.45-0.85)(67), så maner nettsiden til varsomhet pga den relativt lave forekomsten av alvorlige invasive mykoser veid opp mot medisinenes potensielle bivirkninger og høye kostnader. De anbefaler heller et screeningsprogram der man tester transplantasjonsmottakere for kolonisering av luftveiene med *Aspergillus* før transplantasjonen. Etter transplantasjonen anbefaler de regelmessig screening av pasientserum for GM, BG og aspergillus-PCR.

1.8.5. Evidensbaserte behandlingsanbefalinger

Behandling av IA kan deles inn mht modalitet og starttidspunkt. Behandlingen kan være preventiv/ profylaktisk, empirisk, dvs startet på klinisk mistanke eller initiert etter at diagnosen er stilt. Metodene er stort sett medisinske – med fungistatiske og fungicide midler, samt eventuell adjuvant behandling. En sjelden gang kan kirurgi være indisert.

BestPractice

I BMJs anbefalinger BestPractice (26) som baserer seg på evidensbasert kunnskap skiller de mellom *sikker*, *mistenkt* og *empirisk* IA. Sikker diagnose av IA stilles i henhold til konsensuskriteriene, mistenkt IA gjelder høyrisikopasienter med sterk mistanke på bakgrunn av klinikk sammen med radiologiske og serologiske funn. De såkalte mistenkte diagnoser fyller ikke kriteriene for IA trass typisk klinikk hos risikopasienter.

Ved sikker og mistenkt IA anbefales Voriconazol som uten tvil skal være overlegen andre medikamenter både med tanke på effektivitet og bivirkninger. Kun ved intoleranse eller terapivikt anbefales bruk av lipidformuleringer av Amphotericin B. Ved særdeles vanskelige eller kritiske tilfeller kan en kombinasjon av ulike klasser av antimykotika forsøkes. Midlene som virker ulike steder, antas å ha synergetisk effekt, men foreløpig foreligger det for få studier for å kunne dokumentere dette med overbevisende kraft.

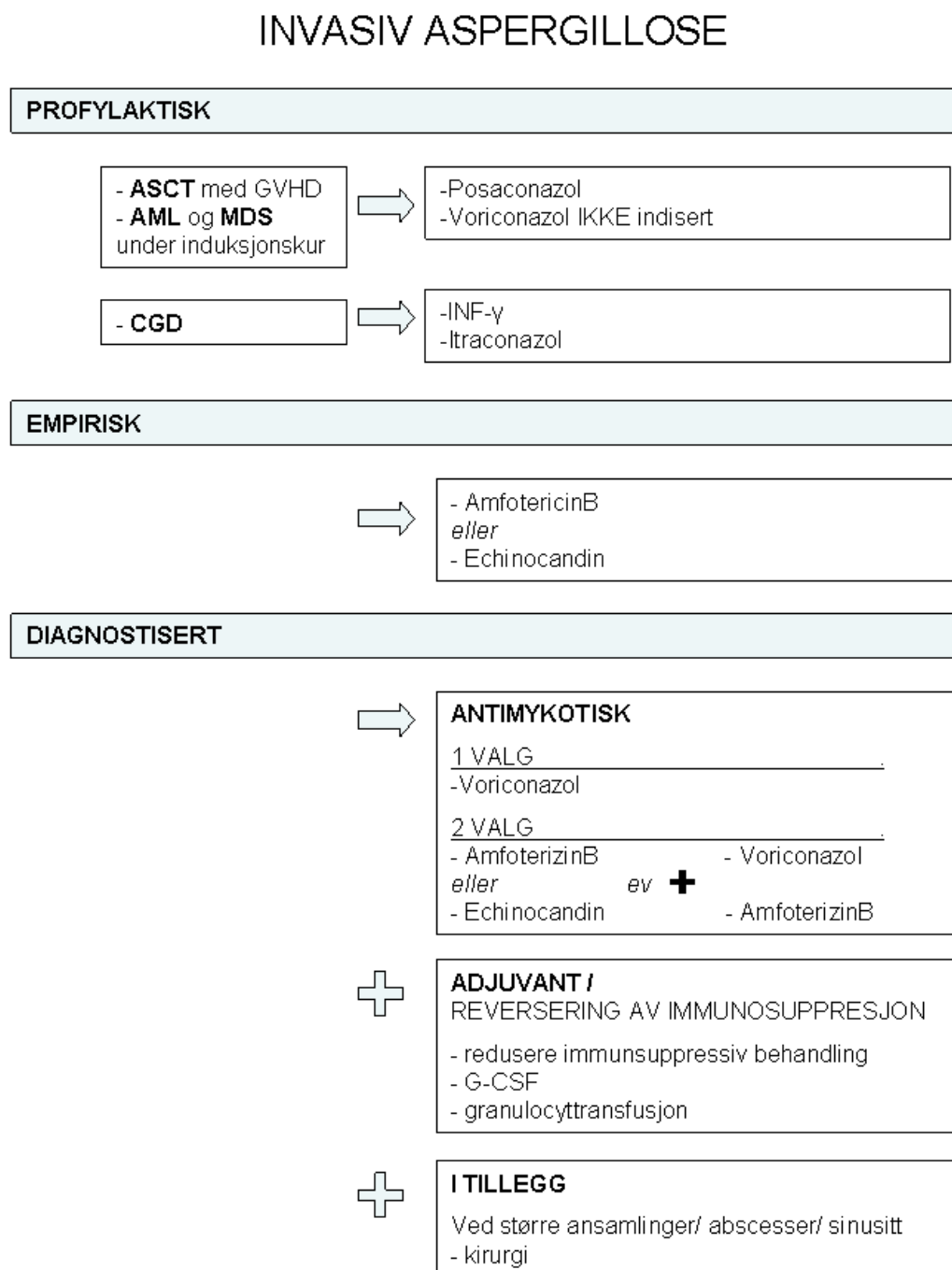
Ved mistenkt IA må en huske på muligheten at pasientens tilstand kan skyldes annen etiologi. Voriconazol er da ikke indisert. Det anbefales å bruke Amphotericin B eller en Echinocandin.

For profylakse hos gravt neutropene pasienter anbefales det brukt Posaconazol.

For behandling av aspergillom er antimykotika i utgangspunktet ikke indisert. Kirurgi for å redusere fungal load og eventuelt nødembolisering av arterier i lungene ved akutt alvorlig hemoptyse, er alternativer som nevnes i BestPractice.

Hos alle pasienter med mistenkt eller sikker IA anbefales det å se på muligheten for reversering av immunsuppresjonen. Sammenfatningsvis har jeg laget et flytskjema over valg av terapi ved IA basert på anbefalinger i BestPractice (se figur 1.6).

Figur 1.6 Behandlingsstrategier anbefalt av BestPractice (26)



ASCT-allogen stamcelletransplantasjon; AML-akutt myelogen leukemi; MDS-myelodysplastisk syndrom; CGD-kronisk granulomatøs sykdom; G-CSG-granulocytstimulerende faktor

UpToDate

Retningslinjene her er stor sett i overensstemmelse med BestPractice. Også de fremhever nødvendigheten av vertens egne immunceller for bekjempelse av invasive soppinfeksjoner. Antimykotika vil på en måte bare kjøpe tid imens.

Medikamenter

- Voriconazol som førstevalg, med intravenøs administrasjon i starten.
- Ukentlig monitorering av serumkonsentrasjon av Voriconazol. Selv om det foreløpig ikke eksisterer et standardisert mål, anbefales konsentrasjonen holdt i området mellom 1 - 5.5 mg/l.
- Amfotericin B for pasienter som ikke tåler eller kan få Voriconazol, og pasienter som ikke har fått bekreftet etiologisk agens med mulighet for zygomycose.
- Ved behandlingssvikt med både Voriconazol og Amphotericin B anbefales det kombinasjonsterapi: Voriconazol eller Amphotericin B + en echinocandin (Caspofungin, Micafungin eller Anidafungin).
- Kombinasjonsterapi er ikke anbefalt som initial behandling.
- Posaconazol for profylakse.

Adjuvant

- G-CSF har, trass kortere neutropeni, økt kjemotakse og fagocytose i kliniske studier, ikke vist å forbedre prognosen ved IA på kort eller lang sikt. Terapien anbefales ikke brukt rutinemessig, men kost/ nytte-vurderingen må gjøres ved hvert enkelte tilfelle.
- Granulocytinfusjoner – for lite datamateriale til å støtte bruken av dette.

Kirurgi

- Vanskeliggjøres av underliggende sykdom og tilstand, og samtidig trombocytopeni.
- Essensiell ved sinusitt.
- Ofte indisert ved perikarditt, endokarditt, empyem, osteomyelitt, cerebrale abscesser, brystveggsabscesser, hemoptyse og abscesser i nærheten av større lungearterier.

2. Materiale og metode

I den teoretiske delen har jeg forsøkt å få svar på grunnleggende spørsmål ved invasive muggsoppinfeksjoner med vekt på og illustrert av aspergillose. Oversikten er laget på bakgrunn av forskningsartikler, oversiktsartikler og lærebøker funnet både gjennom målrettet, systematisk søk i PubMed i aktuelle databaser som Medline og Cochrane Library, samt ved å følge henvisninger/ litteraturoversikter i andre artikler.

Ved valg av artikler vurderte jeg:

- relevans
- publikasjonsdato
- utgiveren
- raten av henvisninger til angitt i PubMed.

Jeg foretrakk systematiske oversikter og metaanalyser, men for å utforske bredden av muligheter inkluderte jeg også enkeltstående forskningsartikler. Søkene og lesing av litteratur foregikk i tidsrommet fra desember 2010 til mars 2011.

Den praktiske delen er basert på datamateriale fra obduksjoner og kliniske journaler ved Oslo Universitetssykehus, Rikshospitalet.

Av hensyn til omfanget av oppgaven ble tidsrommet begrenset til de siste tre årene – dvs fom 20.05.08 tom 19.05.11.

Rikshospitalet ble grunnlagt i 1826. I 2005 fusjonerte sykehuset med det kreftspesialiserte Radiumhospitalet. Rikshospitalet hadde på grunnlag av sin spesialkompetanse hatt omfattende regionale og landsdekkende funksjoner i tillegg til enkelte lokalsykehusoppgaver. 01.01.09 inngikk sykehuset i en ny fusjon og har dannet sammen med Aker Universitetssykehus og Ullevål Universitetssykehus landets største helseforetak - Oslo Universitetssykehus HF. Fusjonen har ført til omfattende intern omstrukturering. OUS-Rikshospitalet er nå høyspesialisert på en rekke fagområder og har dermed både landsfunksjoner og flerregionale funksjoner. Blant Rikshospitalets landsfunksjoner er transplantasjon av organer, epilepsikirurgi, benmargstransplantasjon, bløderkirurgi, komplisert replantasjonskirurgi og transseksualisme. Sykehuset har flerregionale funksjoner for Østfold, Buskerud, Vestfold, Telemark, Aust-Agder, Vest-Agder og deler av Akershus innenfor blant annet neonatalkirurgi, hjertekirurgi for barn og behandling av barn med leppe-, kjeve- og ganespalte, samt standard allogen benmargstransplantasjon, sarkomer og gynekologisk onkologi. Innen visse fagområder, for eksempel barnesykdommer var sykehuset inntil nylig også lokalsykehus for befolkningen i Asker og Bærum. I tillegg tilbyr sykehuset sammen med Ullevål fødeplass og fødepolikliniske tjenester til hele Oslo. Rikshospitalet har nå nærmere 600 senger og rundt 4000 ansatte. Pasientgrunnlaget for Rikshospitalet har skiftet gradvis i takt med den ovennevnte fusjoneringsprosessen og har ikke vært konstant gjennom hele den aktuelle tidsperioden for oppgaven.

For å finne de aktuelle tilfellene av muggsoppfunn tok jeg utgangspunkt i to ulike kliniske registre – registreringer gjort av patologene i forbindelse med obduksjon, samt registreringer på Mikrobiologisk avdeling over muggsoppfunn i tilsendt obduksjonsmateriale. I forbindelse med obduksjon foretas det rutinemessig

mikroskopisk undersøkelse av alle større organsystemer. Ved klinisk mistanke eller tegn til inflammasjon etterstreber obdusenten å bestemme en eventuell infeksjons agens. Ved mistanke om soppinfeksjon blir snittene farget med Grocott. Ved positive funn suppleres dette som regel med immunhistokjemi i form av candida- og aspergillusantistoffer. Ved uttak av vev fra obduksjon til mikrobiologisk diagnostikk tas rutinemessig vev fra begge lunger, lever og milt. Organoverflaten svis med flammeoppvarmet organkniv for å sterilisere organoverflate – og unngå kontaminasjon med bakterier fra obd.benken, vanligvis *E.coli* spp. Deretter skjæres ut en bit vev ca 1x1x1 cm med steril skalpell og pinsett som overføres i sterilt prøveglass. Pasienter som er død etter benamrgstransplantasjon og enkelte andre hvor sopp-infeksjon er mistenkt, blir underkastet denne ekstra-prosedyre. Materiale skal også bli sendt til Mikrobiologisk avdeling der man som regel foretar dyrkning både aerobt og anaerobt, inkludert soppyrking. Det utføres rutinemessig PCR for virus, og ved sterk soppmistanke gjøres PCR for sopp direkte på prøvematerialet ved hjelp av 18S ribosomalt DNA og etterfølgende sekvensering av PCR-produktet.

De aktuelle kasus blant obduksjonsrapportene ble funnet ved å søke i Access-databasen *PatStat 3.6* på koden i gruppene E4000, som inneholder muggsoppfunn, og S05000, som inneholder muggsoppinfeksjoner, etter den internasjonale medisinske nomenklaturen for patologi - SNOMED 1.4.

På Mikrobiologisk avdeling brukes laboratoriedatasystemet *Unilab* for registrering av resultater. For å finne alle muggsoppregistreringene ble det brukt søkestrengen "*Sopp (ekskl gjærsopp)*".

Listene over funn fra patologene og mikrobiologene var ikke identiske. Jeg startet med å studere obduksjonsrapportene med eventuelle svar fra mikrobiologiske undersøkelser. I gjennomgangen la jeg vekt på

- hva som ble oppfattet som den umiddelbare dødsårsak
- om det var makroskopiske og/ eller mikroskopiske endringer som kunne tilskrives muggsoppinfeksjon
- om det ble foretatt Grocott-farging og ev immunhistokjemiske undersøkelser.

Deretter studerte jeg journalnotatene lagret i *DocuLive* med tilhørende svar på rekvirerte prøver og undersøkelser registrert i *Klinisk Portal*. Ved journalgjennomgang registrerte jeg følgende forhold:

- til grunnleggende sykdom/ immunsvekkelse
- klinisk mistanke om muggsoppinfeksjon ante mortem
- resultatene fra røntgenundersøkelse, blodkultur, dyrkning av ekspektorat og BAL
- om det var gitt behandling for mulig muggsoppinfeksjon.

I den endelige vurdering om det forelå en infeksjon eller forurensning, støttet jeg meg på konsensuskriteriene for invasiv aspergillose i følge EORTC/MSG (se kap 2.7.6). I de tilfellene der obduksjonsbeskrivelsen ikke ga støtte for mikrobiologiske funn, la jeg til grunn at den mikroskopiske histopatologiske undersøkelsen i forbindelse med obduksjon var fasiten, mens positiv dyrking uten histopatologisk støtte tydet på forurensning.

3. Resultater

Mitt utgangspunkt for oppgaven var obduksjonsfunn ved Rikshospitalet. I all hovedsak er det pasienter fra Rikshospitalet og Radiumhospitalet som blir obdusert på patologisk avdeling på Rikshospitalet. Det er behandlende leger som vil kunne rekvirere obduksjon. Men før dette kan skje, må det etter ny forskrift av 2004 innhentes samtykke fra pårørende. I den aktuelle treårsperioden var antall obduksjoner fallende ved RH (se tabell 3.1).

Tabell 3.1 Obduksjonsrate ved OUS-RH, 2008 - 2011

Periode	Antall dødsfall	Antall obduksjoner	Obduksjonsrate
20.05.08 – 19.05.09	272	211	78 %
20.05.09 – 19.05.10	291	194	67 %
20.05.10 – 19.05.11	307	165	54 %

For å finne de aktuelle tilfellene av muggsoppfunn, innhentet jeg data fra to registre. I obduksjonsrapporter blir alle funn registrert med koder etter gjeldende nomenklatur i SNOMED 1.4. Det korrekte vil være å registrere alle funn av infeksjose agens med E-koder, men det forekommer også at obdusenten registrerer funnet som infeksjon med S-koden. De aktuelle kasus fant jeg ved å søke i Access-databasen PatStat 3.6 på koder for både uspesifisert soppinfeksjon og spesifiserte muggsopp (se tabell 3.2).

Tabell 3.2 Resultater av søk på aktuelle SNOMED-koder

SNOMED 1.4 kode	Hovedbetydning	Funn i aktuell periode
E40000	sopp UNS	2
E40100	phycomyces UNS	0
E40220	mucor UNS	0
E40610	aspergillus UNS	3
S05500	soppinfeksjon UNS	8
S05670	mucormykose	0

Obdusentene hadde registrert muggsopp ved 12 (ett tilfelle var registrert med både E- og S-kode) av i alt 570 obduksjoner, dvs ved ca 2 % av alle obduksjoner i den aktuelle tidsperioden.

Det sendes rutinemessig inn vevsprøver fra lunger, milt og lever til mikrobiologisk undersøkelse ved obduksjon av immunsuprimerte pasienter. Ved særlig mistanke eller kjent patologi (f.eks abscesser) inkluderes vevsmateriale også fra slike områder. Prøvene skal tas og behandles med sterile teknikker. På Mikrobiologisk avdeling ble det i den aktuelle treårsperioden registrert positive muggsoppdyrkninger fra materiale innsendt fra 31 obduksjoner.

Sammenlagt fant jeg altså 37 unike kasus der dyrkning og/ eller obduksjonsfunn var positive for muggsopp. Listene over funn fra patologene og mikrobiologene var ikke sammenfallende – det var gjort 13 registreringer hos patologene mot 31 registreringer hos mikrobiologene.

På bakgrunn av obduksjonsrapportene og journalnotatene om det kliniske forløpet, samt tilhørende kurver og prøvesvar, laget jeg en liste (tabell 3.3) over alle aktuelle kasus (kasus 1 – 37) i den begrensede tidsperioden på tre år (20.05.08 – 19.05.11). I den endelige avgjørelsen om det dreide seg om en reell infeksjon eller sannsynlig kontaminasjon, ga jeg den mikroskopiske histopatologiske undersøkelsen i forbindelse med obduksjon mest vekt. Obduksjonene ble foretatt av i alt 7 forskjellige leger/ overleger – kodet i oversikten med bokstaver fra A til G.

Tabell 3.3 Oversikt over alle muggsoppfunn, mikrobiologiske og/ eller patologiske registre, fom 20.05.08 tom 19.05.11.

Kasus	Obduksjonsdato	Alder	Grunnsykdom	Soppart	Lokalisasjon	Mistenkt	Behandlet*	Dyrkning**	Forurensning	Obdusent
1	22.05.2008	44	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge, benmarg	NEI	NEI	JA	JA	A
2	26.05.2008	67	avansert ungekreft	<i>Aspergillus uspes</i>	lunge	NEI	NEI	NEI	NEI	F
3	18.08.2008	56	leukemi	sopp uspes	lever	NEI	NEI	NEI	NEI	G
4	01.09.2008	64	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	NEI	G
5	16.09.2008	60	pulmonal fibrose	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	A
6	16.02.2009	63	organtransplantasjon	<i>A. fumigatus</i>	lunge	JA	JA	NEI	NEI	C
7	04.03.2009	33	lymfom	<i>A. fumigatus</i>	lunge	JA	JA	JA	JA	B
8	07.07.2009	42	Noonans syndrom	<i>Penicillium + Paecilomyces</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	C
9	21.08.2009	50	leukemi	<i>Aspergillus uspes</i>	lunge	JA	JA	JA	NEI	C
10	29.10.2009	25	H1N1-influenza	<i>A. versicolor</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	C
11	09.12.2009	37	H1N1-influenza	<i>A. fumigatus</i>	lunge	JA	JA	JA	NEI	A
12	13.01.2010	24	lymfom	muggsopp uspes	lunge, lever, milt, nyre, hjerne, ventrikkell	NEI	JA	JA	NEI	C
13	21.01.2010	66	myelodysplasi	<i>Rhizopus microsporus</i>	lunge, nyre, milt, lever, hjerne	JA	JA	JA	NEI	C
14	06.05.2010	55	lungfibrose	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	JA	JA	JA	A
15	19.07.2010	73	pankreatitt og aspirasjonspneumoni	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
16	21.07.2010	72	organtransplantasjon	<i>A. flavus + A. fumigatus</i>	milt	NEI	NEI	JA	JA	E
17	23.08.2010	51	organtransplantasjon og lungfibrose	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	D
18	25.08.2010	18	Carneys triade med lungekomplikasjoner	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	D
19	03.09.2010	58	materiale tilsendt fra Haugesund	<i>A. niger</i>	flere organer	?	?	JA	JA	
20	08.10.2010	47	leukemi	<i>Aspergillus uspes</i>	tarmepitel	NEI	JA	NEI	NEI	E
21	27.12.2010	53	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	JA	JA	JA	E
22	17.01.2011	10	hereditær immundefekt	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	B
23	24.01.2011	0	fosterdød	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
24	25.01.2011	0	fosterdød	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
25	26.01.2011	61	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	hjerne, lever, nyre, ventrikkell	NEI	JA	JA	NEI	E
26	28.01.2011	63	AIDS	<i>A. fumigatus</i>	Lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
27	31.01.2011	33	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	Lunge	NEI	NEI	JA	JA	B
28	03.02.2011	64	organtransplantasjon	<i>A. fumigatus</i>	Lunge	NEI	JA	JA	JA	B
29	10.02.2011	24	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
30	23.02.2011	60	Ingen underliggende sykdom	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	E
31	15.03.2011	44	SLE og organtransplantasjon	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	B
32	28.03.2011	48	immunsuppresjon pga psoriasis	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	B
33	15.04.2011	39	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	JA	JA	JA	D
34	02.05.2011	68	lymfom	<i>A. fumigatus</i>	lunge, milt	NEI	NEI	JA	JA	D
35	04.05.2011	0	fosterdød	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	D
36	12.05.2011	55	lymfom	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	JA	JA	JA	B
37	19.05.2011	3	leukemi	<i>A. fumigatus</i>	lunge	NEI	NEI	JA	JA	D

* Når det gjelder behandling, fikk mange høyriskopasienter, f.eks leukemipasienter ved induksjon og ved kondisjonering før benmargstransplantasjon, soppfylakse i form av Flukonazol (Diflucan). Dette midlet er ikke virksomt mot muggsoppinfeksjoner og pasienten ble dermed regnet som *ikke behandlet* i min oversikt.

** *Post mortem*, agens kunne være påvist også ved et tidligere tidspunkt

Blant disse 37 registreringene var det ett tilfelle der obduksjonsmateriale var tilsendt fra Haugesund. Siden denne obduksjonen, eller sykehusoppholdet, ikke ble gjennomført på Rikshospitalet, måtte kasus 19 ekskluderes fra datagrunnlaget i den videre analysen.

3.1. Forurensning

I dette materialet konkluderte jeg på bakgrunn av ovennevnte kriterier at av totalt 36 registreringer kunne 26 regnes som forurensning – dette utgjør 72% av alle tilfellene.

Fordelingen av forurensningstilfellene innen den aktuelle treårsperioden var ikke jevn (se tabell 3.4). I den siste perioden forekom tilfellene til en viss grad puljevis – dvs tidsmessig tett på hverandre med få dagers mellomrom, og gjerne utført av samme obdusent på vakt (se tabell 3.5). Det var i alt 7 obdusenter, deriblant 1 overlege (obdusent G), som utførte de 36 aktuelle obduksjoner. Antall obduksjoner og totalt og andel reelle infeksjoner/ forurensninger var svært varierende bland obdusentene (se tabell 3.6).

Tabell 3.4 Forurensninger

Tidsperiode	Antall forurensninger
20.05.08 – 19.05.09	3
20.05.09 – 19.05.10	3
20.05.10 – 19.05.11	20

Tabell 3.5 Forurensninger som forekom i tidsmessige opphopninger (clusters)

Kasus	Soppart	Tidspunkt	Obdusent
15	A. fumigatus	19.07.10	E
16	A. fumigatus + A. flavus	21.07.10	E
17	A. fumigatus	23.08.10	D
18	A. fumigatus	25.08.10	D
23	A. fumigatus	24.01.11	E
24	A. fumigatus	25.01.11	E
26	A. fumigatus	28.01.11	E
27	A. fumigatus	31.01.11	B
28	A. fumigatus	03.02.11	B
34	A. fumigatus	02.05.11	D
35	A. fumigatus	04.05.11	D

Tabell 3.6 Obduksjoner og forurensninger fordelt på obdusent

Obdusent	Totalt obduksjoner	Antall forurensninger	Andel forurensninger
A	4	3	0,75
B	7	7	1,00
C	6	2	0,33
D	6	6	1,00
E	10	8	0,80
F	1	0	0,00
G	2	0	0,00

Av sopparter i forurensninger dreide det seg i all hovedsak A. fumigatus (se også tabell 3.7). To av tilfellene, kasus 8 og 16, ble det dyrket frem to sopparter.

Tabell 3.7 Frekvens av sopparter

Soppart	Antall ganger	Kasus
A fumigatus	24	1, 5, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37
A. flavus	1	16
A. versicolor	1	10
Penicillium	1	8
Paecilomyces	1	8

Det er nesten uten unntak at alle tilfeller av forurensning gjelder dyrkning av vevsprøve fra lunger (se tabell 3.8). I 25 av 26 gjaldt dette lungevev, hvorav 23 hadde positivt utslag kun fra lunge, mens 2 hadde i tillegg oppvekst fra milt eller benmarg. Kun ett tilfelle viste oppvekst av muggsopp fra et annet organ uten samtidig oppvekst fra lungevev.

Tabell 3.8 Frekvens per lokalisasjon

Lokalisasjon	Antall ganger	Kasus
Kun lungevev	23	5, 7, 8, 10, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37
Lungevev + andre organer	2	1, 34
Annet organ uten lunge	1	16

3.2. Infeksjoner

Av totalt 36 muggsoppregistreringer, er det grunn til å anta at det var 10 (28%) som dreide seg om reelle infeksjoner (se tabell 3.9). Ett av disse tilfellene (kasus 20) mener obdusenten at dreier seg om kolonisering av tarmepitel som ikke var klinisk signifikant.

Tabell 3.9 Reelle infeksjoner

Kasus	Dato	Alder	Grunnsykdom	Soppart	Lokalisasjon	Mistenkt	Behandlet	Dyrkning
2	26.05.2008	67	avansert lungekreft	Aspergillus uspes	lunge	NEI	NEI	NEI
3	18.08.2008	56	Leukemi	sopp uspes	lever	NEI	NEI	NEI
4	01.09.2008	64	leukemi	A. fumigatus	lunge	NEI	NEI	JA
6	16.02.2009	63	organtransplantasjon	A. fumigatus	lunge	JA	JA	NEI
9	21.08.2009	50	leukemi	Aspergillus uspes	lunge	JA	JA	JA
11	09.12.2009	37	H1N1-influenza	A. fumigatus	lunge	JA	JA	JA
12	13.01.2010	24	lymfom	muggsopp uspes	lunge, lever, milt, nyre, hjerne, ventrikk	NEI	JA	JA
13	21.01.2010	66	myelodysplasi	Rhizopus microsporus	lunge, nyre, milt, lever, hjerne	JA	JA	JA
20	08.10.2010	47	leukemi	Aspergillus uspes	tarmepitel	NEI	JA	NEI
25	26.01.2011	61	leukemi	A. fumigatus	hjerne, lever, nyre, ventrikk	NEI	JA	JA

3.2.1. Tidsmessig fordeling

Fordelingen av forekomsten av infeksjoner var nokså jevnt fordelt med frekvens på 2-4 per år (se tabell 3.10).

Tabell 3.10 Tidsmessig fordeling av muggsoppinfeksjoner

Tidsperiode	Antall tilfeller infeksjoner
20.05.08 – 19.05.09	4
20.05.09 – 19.05.10	4
20.05.10 – 19.05.11	2

3.2.2. Artsbestemmelse

Bestemmelsen av infeksjons agens i de 10 tilfellene av reell infeksjon har varierende spesifisitet. I de fleste tilfellene kan vi komme ned på slektsnivå der *Aspergillus* var igjen dominerende, men identifiseringen på artsnivå er avhengig av vellykket dyrkning og/ eller nukleinsyreamplifisering/sekvensering. Dette var ikke tilfelle på langt nær de fleste kasus i oversikten (se tabell 3.11).

Table 3.11 Artsbestemmelse ved reelle infeksjoner

Kumulativ frekvens / antall	Agens	Kasus	Dyrket	Kommentarer
4	<i>A. fumigatus</i>	4	JA	
		6	NEI	Positiv dyrkning av BAL ante mortem
		11	JA	
		25	JA	
7 (+3)	<i>Aspergillus</i> uspes	2	NEI	Ingen prøve sendt til mikrobiologisk undersøkelse. Agens bestemt på mikroskopisk morfologi og passende klinikk.
		9	JA	Dyrkning post mortem negativ. Klinikk forenlig med mulig invasiv aspergillose. Mikroskopisk morfologi ved obduksjon typisk for <i>Aspergillus</i> . Immunhistokjemi negativ. PCR 18S positiv, men uspesifikk pga dårlig materiale. ITS rDNA negativ.
		20	NEI	Mikroskopisk morfologi ved obduksjon tyder på <i>Aspergillus</i> på tarmepitel. Obdusenten antar kolonisering. Ingen prøve fra tarmepitel sendt til mikrobiologisk undersøkelse.
8 (+1)	<i>Muggsopp</i> uspes	12	JA	Dyrkning post mortem negativ. Morfologi ved obduksjon viser angioinvasive soppelementer forenlig med <i>Zygomycetes</i> eller <i>Aspergillus</i> . 18S rDNA av FNAC av leverabscessen ante mortem positiv for muggsopp – sekvensering viser blandet flora.
9 (+1)	<i>Sopp</i> uspes	3	NEI	Ved obduksjon sees det nekrotiske foci i lever forenlig med sopp. Ingen beskrivelse av morfologi. Ingen immunhistokjemisk farging eller mikrobiologiske undersøkelser.
10 (+1)	<i>Rhizopus microsporus</i>	13	JA	

Av totalt 10 kasus:

- I under halvparten av tilfellene foreligger det et positivt svar etter mikrobiologisk undersøkelse med artsbestemmelse post mortem (kasus 4, 10, 11 og 25).
- Ved fire tilfeller (kasus 3, 6, 7 og 20) ble det ikke sendt adekvat materiale til mikrobiologisk undersøkelse. Dog forelå det ved ett tilfelle (kasus 6) positivt dyrkningssvar fra BAL ante mortem.
- I halvparten av tilfellene ble agens bestemt kun på bakgrunn av morfologi ved mikroskopering av Grocott-fargete snitt, enten pga manglende rekvirering (kasus 3, 7 og 20) eller pga negativt svar (kasus 9 og 12) fra mikrobiologiske undersøkelser.
- I de to tilfellene (kasus 9 og 12) der dyrkning var negativ, hadde begge pasienter blitt behandlet med muggsoppeffektive antimykotika (kasus 9: Caspofungin og liposomalt AmfoterisinB; kasus 12: Caspofungin og Pozaconazol) i minst 3 uker ante mortem.
- Ved dyrkningssvikt ble det ved et tilfelle (kasus 9) foretatt nukleinsyreamplifisering/sekvensering som slo ut positivt for 18S rDNA (dog uspesifikk pga dårlig materiale), men senere negativt for ITS rDNA.
- I alt ble det brukt nukleinsyreamplifisering/sekvensering ante mortem hos tre pasienter (kasus 9: blodkultur og BAL, kasus 12: FNAC av leverabscess og kasus 13: cerebrospinalvæske), hvorav to positive svar for sopp (kasus 12 og 13).

3.2.3. Lokalisasjon

De fleste (7 av 10) tilfellene av muggsoppinfeksjoner ble funnet i lungevev. I 2 av disse ble muggsopp dyrket frem i tillegg fra andre organer som lever, milt, nyre og hjerne.

Ved 3 tilfeller (kasus 3, 20 og 25) ble det ikke funnet tegn på muggsoppinfeksjon i lungene. Ved 2 av disse (kasus 3 og 20) ble det heller ikke foretatt rutinemessig dyrkning, spesialfarging eller immunhistokjemisk undersøkelse av lungevev.

I kasus 3 beskrives det multiple nekrotiske foci i leveren som obdusenten antar å være sopp, lungene uten tegn til pneumoni.

I kasus 25 beskrives det utbredt sepsis med soppfoci i hjerte, lever og nyre i tillegg til dødelig blødningsfokus i ventrikkelen som var positiv for aspergillus ved immunhistokjemisk undersøkelse. Lungene uten inflammatoriske forandringer.

I kasus 20 hadde pasienten hatt langvarig hemoragisk enterokolitt. Mikroskopisk fant obdusenten tarmiskemi pga transplantasjonsassosiert microangiopati samt sopphyfer forenlig med aspergillus ved farging med Grocott. Tarmmateriale ble ikke sendt til mikrobiologisk undersøkelse. Lungene og milten hadde ikke inflammatoriske forandringer som ble bekreftet av negative dyrkningssvar.

3.2.4. Underliggende tilstand

Pasientgruppen på 10 personer i mitt utvalg der man ved obduksjon fant reell muggsoppinfeksjon, har en aldersmessig spredning fra 24 til 67 år, med gjennomsnittsalder på 53,5 og medianalder på 58,5 år. Majoriteten (7 av 10) var i behandling for hematologisk malignitet som leukemi, lymfom og myelodysplasi (se tabell 3.12). Resten (3 pasienter) hadde immunsvekkelse av andre årsaker som medikamentell immunsuppresjon etter transplantasjon, avansert lungekreft eller langvarig alkoholisk hepatitt og pankreatitt toppet med svineinfluensapneumoni.

Tabell 3.12 Underliggende sykdom

Diagnosegruppe	Hoveddiagnose	Andre diagnoser/ immunsuppresjon	Kasus nr
Hematologisk malignitet	AML	HSCT	9
		HSCT, GVHD	20
	ALL	cytostatika	25
	KML	HSCT	3
	KLL	høydosesteroider	4
	MDS		13
	Hodgins lymfom	HSCT, GVHD	12
Annen malignitet	avansert NSCLC	hjernemetastaser med nevrologiske komplikasjoner	2
Transplantasjon	lever TX	sarkoidose	6
Komplisert alkoholisme	influenzapneumoni type A (H1N1)	kronisk steatohepatitt og pankreatitt	11

HSCT - Hematopoietic stem cell transplantation

GVHD - Graft-versus-host disease

NSCLC - Non-small-cell lung carcinoma

3.2.5. Mistenkt soppinfeksjon og behandling

I 6 av 10 tilfellene var muggsoppinfeksjonen ikke mistenkt ante mortem (kasus 2, 3, 4, 12, 20 og 25). Av resterende 4 tilfeller ble ved ett tilfelle (kasus 13) infeksjonen påvist først to dager før de dødelige komplikasjonene. Det vil si at ved kun 3 av 10 tilfeller (kasus 6, 9 og 11) hadde man bevis for eller klinisk mistanke om muggsoppinfeksjon før det fatale utfallet. Ett av tilfellene av ikke mistenkt muggsoppinfeksjon (kasus 25) hadde pasienten hatt soppsepsis med en gjærsopp (*Candida krusei*), men etter seponering av CVK hadde pasienten hatt negative blodkulturer i 12 dager ante mortem.

Når det gjelder behandling er det flere pasienter som fikk midler virksomme mot muggsopp enn antall tilfeller med klinisk mistanke (se tabell 3.13). I tillegg til erkjente infeksjoner (kasus 6, 9, 11 og 13), fikk ytterligere 3 pasienter (kasus 12, 20 og 25) antimikrobielle midler som er fungicide også mot muggsopp. Resterende tilfellene – 3 av 10 (kasus 2, 3 og 4) var muggsoppinfeksjonen hverken mistenkt eller empirisk eller profylaktisk behandlet. Ett av disse (kasus 4) ble behandlet med Fluconazol som er standardprofylakse ved stamcelletransplantasjon på Rikshospitalet. Midlet har som kjent ingen effekt på muggsopp.

Tabell 3.13 Behandling av soppinfeksjonene

Kasus	Mistenkt	Behandlet	Lengde	Middel og døgndose
6	Ja	Ja	9 dager	Voriconazol 600 mg
9	Ja	Ja	3 dager 17 dager	Caspofungin 50 mg AmfotericinB 240 mg
11	Ja	Ja	5 dager	Caspofungin 50 mg
13	Ja*	Ja*	2 dager	AmfotericinB 350 mg
12	Nei	Ja	6 måneder 1 måned	vekselvis Fluconazol og Caspofungin 50 mg Posaconazol 600 mg
20	Nei	Ja	2 måneder	Caspofungin 50 mg
25	Nei	Ja	6 dager 4 dager 11 dager	Caspofungin 50 mg Posaconazol 600 mg AmfotericinB 180 mg
2	Nei	Nei**		
3	Nei	Nei**		
4	Nei	Nei**		

* Det forelå ingen mistanke om soppinfeksjon frem til 2 dager ante mortem da dyrkningen påviste *Rhizopus microsporus* og behandlingen mot soppinfeksjon iverksatt.

** Ingen behandling eller behandlet med uvirksomt middel.

Diskusjon

Funnene i denne oppgaven må tolkes med forsiktighet. For det første vil alle tallene (prosent og andeler) ha svært stor usikkerhet knyttet til seg eller kan ikke regnes å være statistisk signifikante pga svært lite utvalg. For det andre er både pasientgrunnlaget og diagnosene spesielle. Det dreier seg om dødsfall blant pasientene på landets mest spesialiserte sykehus – OUS-Rikshospitalet. Og diagnosen - invasive muggsoppinfeksjoner - er i seg sjelden forekommende og sees kun hos en selektiv gruppe pasienter. Likevel mener jeg at kasus her kan avdekke og illustrere utfordringer knyttet til diagnostisering og behandling av slike infeksjoner på et mer generelt grunnlag. Og dataene her kan brukes til å sammenligne Rikshospitalet med andre tilsvarende sykehus. Rikshospitalet er eneste tx-sykehus i Norge.

3.3. Forekomst

Som tidligere nevnt er invasive muggsoppinfeksjoner en sjelden diagnose i norsk sammenheng. Og selv om gruppen er økende, forekommer slike mykoser kun hos sterkt immunkompromitterte pasienter. I følge data generert på direkte forespørsel til seksjonen for Ledelsesinformasjonssystemet (LIS) ved OUS (se tabell 4.1) var det registrert følgende antall sykehusopphold, muggsoppinfeksjoner og dødsfall på Rikshospitalet og Radiumhospitalet i den aktuelle treårsperioden (uttrekk fra aktivitets- og kvalitetsdata ved konsulent Viggo Skar, seksjon LIS OUS).

Tabell 0.1 Data fra LIS OUS om muggsoppdiagnoser og dødsfall

Periode	Antall sykehusopphold totalt		B4* diagnoser		Andel B4* diagnoser per pasient(opphold)		Antall dødsfall totalt	
	RH	RA	RH	RA	RH	RA	RH	RA
2008.05.20-2009.05.19	25 605	3 554	3	1	0,012%	0,028%	214	58
2009.05.20-2010.05.19	25 154	3 776	2	0	0,008%	-	230	61
2010.05.20-2011.05.19	25 397	3 906	0	0	-	-	257	50

*B4 inkluderer alle muggsoppdiagnosene blant soppinfeksjonene i ICD-10.

Det var ikke mulig å fremskaffe statistikk for antall dødsfall forbundet med invasive muggsoppinfeksjoner på sykehusnivå, men på direkte forespørsel (svar per email fra rådgiver Grethe Westby, Statistisk sentralbyrå, seksjon for helsestatistikk) kunne Statistisk Sentralbyrå, som behandler dataene samlet av Folkehelseinstituttet, bekrefte at det de siste årene har forekommet svært få dødsfall i forbindelse med ICD-10 diagnosene *aspergillose* (B44) og *zygomykose* (B46).

Tabell 0.2 Dødsfall av muggsoppinfeksjoner i Norge

Kalenderår	Dødsfall B44 + B46 for hele Norge
2008	1
2009	2
2010	4

Som det fremkommer fra oversikten (se tabell 4.2), er den registrerte morbiditeten og mortaliteten av invasive muggsoppinfeksjoner i landet svært lav – et par tilfeller i året. Umiddelbart kan man se en diskrepans mellom data fra LIS, SSB og mine funn (se tabell 4.3).

Tabell 0.3 Sammenligning av data fra LIS og funn i denne oppgaven

Periode	B4* diagnoser ifølge LIS	Antall reelle infeksjoner i mitt utvalg	Kasus nr
	RA + RH	RA + RH	RA + RH
2008.05.20-2009.05.19	4	4	2, 3, 4 og 6
2009.05.20-2010.05.19	2	4	9, 11, 12 og 13
2010.05.20-2011.05.19	0	2	20 og 25

Dette kan skyldes rutiner for registrering av diagnoser i journalsystemer og innrapportering av dødsårsaker. Det er vanskelig å forklare hvorfor flere av kasusene i mitt utvalg ikke har blitt registrert i statistikken. Kan hende at premortalt ukjente infeksjoner som blir oppdaget ved post mortem undersøkelsene ikke blir registrert etterskuddsvis. Eller at man ikke anser det nødvendig eller interessant å presisere agens ved alle infeksjoner, selv ved dødelig utfall.

Ved dødsfall og kjent infeksjon oppstår det problemstilling om infeksjonen skal registreres som *direkte dødsårsak* (diagnose Ia), *underliggende aktuell tilstand* (Ib, Ic osv) eller som *andre vesentlige tilstander som kan ha bidratt til dødens inntreden, men som ikke direkte førte til den aktuelle tilstanden eller døden* (II eller Bifunn). Man kan forestille seg et scenario der en pasient som er innlagt for stamcelletransplantasjon i forbindelse med behandlingen av sin leukemi får i aplasifasen invasiv infeksjon med aspergillus i magesekken som fører til erosjon og blødning med påfølgende hematemese og aspirasjon som i sin tur ender med akutt aspirasjonspneumoni, respiratorisk distress og respirasjonssvikt som fører til døden, kan man forstå at ulike leger vil kunne kode forskjellig på dødsattesten, og at aspergillus ikke bli nevnt blant dødsårsakene. Alle dødsfall meldes av lege som fyller ut en dødsmelding. Dødsmeldingene samles i Dødsårsaksregisteret som koder opplysningene etter det internasjonale systemet ICD og bestemmer dødsårsaken som brukes i dødsårsaksstatistikken (underliggende dødsårsak). Det er viktig å merke seg at obduksjonsrapportene ikke alltid anses som fasit når Dødsårsaksregisteret skal registrere dødsårsaken. Registeret sammenligner patologenes funn med den opprinnelige dødsattesten og har sine regler for hvilke sykdomsprosesser som anses som viktigst.

Selv om prevalensen av invasive muggsoppinfeksjoner nok holder seg svært lav, er det grunn til å tro at det også forekommer underrapportering. Og at vi må ta høyde for at den offentlige statistikken pga ovennevnte manglene ikke kan gi oss et sant bilde av forekomsten av invasive muggsoppinfeksjoner med dødelig utfall.

3.4. Forurensning

For å finne de aktuelle tilfellene av muggsoppfunn tok jeg utgangspunkt i to ulike kliniske registre – registrering gjort av patologene i forbindelse med obduksjon, samt registreringen på Mikrobiologisk Institutt over muggsoppfunn i tilsendt obduksjonsmateriale. I alt identifiserte jeg altså 36 kasus - 12 på patologiliste og 31 på mikrobiologiliste. I en ideell verden skulle disse listene vært sammenfallende. Den store diskrepansen kunne i utgangspunktet tenkes å skyldes enten forurensning eller uoppdaget infeksjon.

Etter min gjennomgang av all tilgjengelig dokumentasjon, kom jeg frem til at av totalt 36 registrerte muggsoppfunn, dreide hele 72% (26 kasus) seg om en sannsynlig forurensning. Jeg må ta forbehold om at det i utgangspunktet ofte vil være vanskelig med sikkerhet å avgjøre om oppvekst av muggsopp ved dyrkning uten klinisk eller histopatologisk støtte er forurensning eller kolonisering, eventuelt infeksjon på et svært tidlig stadium. Dersom det virkelig dreier seg om forurensning, er det naturlig å spørre hvor kontaminasjonen finner sted. Er det i obduksjonssalen ved bruk av urene verktøy eller urene teknikker? Det samme kan man spørre om rutinene på mikrobiologisk laboratorium.

Det er tydelig at den tidmessige fordelingen av forurensningene ikke er jevn. I det siste året forekom det 20 tilfeller av antatt kontaminasjon mot 3 i de foregående årene. Disse 20 tilfellene forekom i tillegg delvis i puljer – dvs tett etter hverandre med få dagers mellomrom (se tabell 3.5). Igjen blir det på nivå av spekulasjoner å prøve å relatere dette til steder eller helsepersonell pasienten var i kontakt med ante og post mortem. Kanskje dreier det seg om en omlegging av obduksjons- eller dyrkningsrutiner eller innføring av nye teknikker? Eventuelt kan det ha oppstått en kontaminasjonskilde i begynnelsen av det siste året som har ført det høye tallet av forurensninger.

Jeg har også prøvd å knytte dette opp mot obdusentene, som kan regnes å ha sine mer eller mindre sterile teknikker og (u)vaner. Trass i stor spredning i andelen av forurensede prøver (0-100%), er det totale antall obduksjoner hver obdusent utførte i denne undersøkelsen for liten til å kunne påvise en reel forskjell mellom obdusentene (se tabell 3.6).

I tillegg er det påfallende at 25 av de 26 tilfeller forurensning gjaldt vevsprøver fra lunger (se tabell 3.8). For reelle muggsoppinfeksjoner ville dette vært helt naturlig siden muggsopp og sporene gjerne spres via luft og inhaleres av oss alle daglig i store mengder. Men dersom disse 26 kasusene dreide seg om forurensning, er det oppsiktsvekkende at 23 av disse hadde positiv dyrkning *kun* fra lungene. Dersom forurensningskilden befant seg i obduksjonssalen eller på mikrobiologisk laboratorium, ville man forventet at flere av prøvene var blitt utsatt. Kanskje inneholder menneskelunger, eller ihvertfall alvorlig syke pasienters respirasjonsveier et antall muggsoppelementer også før døden. I obdusentens mikroskop vil de pga lite antall og manglende inflammatorisk respons ikke kunne oppdages. Men ved dyrking kun de gi opphav til enkelte kolonier som da mistolkes som forurensning. Samtidig må det bemerkes at uten klinisk eller makroskopisk mistanke er det, i følge obduksjonsrapportene, oftest kun vevsprøve fra lungene som sendes inn til rutinemessig dyrkning.

Forurensning ser ut til å være ganske omfattende problem når det gjelder muggsoppfunn i autopsimateriale. Når 26 av 36 positive dyrkninger (siste året i perioden 20 av 22!) dreier seg om forurensning, kan man stille spørsmålstegn ved verdien av post mortem mikrobiologisk undersøkelse for muggsopp i det hele tatt. Det hadde dog vært interessant å systematisk gå gjennom alle trinnene i kjeden fra obduksjon, prøvetaking, forsendelse og dyrkning på mikrobiologisk laboratorium for å avdekke kildene til dette.

3.5. Pasientene med invasiv aspergillose

Når det gjelder de reelle infeksjonene, var den lille gruppen på 10 kasus i mitt utvalg ikke avvikende fra det som var forventet på bakgrunn av generell viten om slike infeksjoner. De fleste hadde en alvorlig immunsvekkelse, mange hematologisk malignitet (se tabell 3.12). De fleste hadde lungeaffeksjon, enten som eneste fokus eller som antatt utgangspunkt for spredning. Og de fleste infeksjonene, i den grad det ble foretatt artsbestemmelse, var forårsaket av *Aspergillus*, fortrinnsvis *fumigatus* (se tabell 3.16). Allikevel må man være forsiktig med å utvide disse funnene til å gjelde resten av pasienter med invasive muggsoppinfeksjoner, enten på Rikshospitalet eller andre sykehus i landet. For utvalget mitt var selektert – de obduserte ved Rikshospitalet i den aktuelle treårsperioden. For det første er pasientpopulasjonen ved Rikshospitalet helt spesielt (se kap 3). For det andre er det kun de dødelige infeksjonene som eventuelt kunne bli med i denne oppgaven. Hvor mange og hvem som klarte seg gjennom disse infeksjonene uten dødelig utfall sier denne oppgaven ingen ting om. Og for det tredje er det ikke alle dødsfall på sykehus som blir gjenstand for en post mortem undersøkelse. Med obduksjonraten på drøyt halvparten, er det en del usikkerhet knyttet til hvordan denne seleksjonen har foregått. Men denne pasientgruppen er i utgangspunktet høyt prioritert av klinikere og patologer mht diagnostikk, inkludert obduksjon, og det kan antas at de fleste med mistenkt eller verifisert soppinfeksjon som dør, er blitt obdusert.

Obduksjonsraten har vært fallende så vel i Norge som i resten av verden. I 1970 og 80-årene ble det årlig gjennomført rundt 6000 sykehusobduksjoner i Norge. Fra 1990-årene har antallet falt drastisk. Etter årtusenskiftet lå den generelle obduksjonsfrekvensen på rundt 12%. (68) I fagmiljøet er det eksperter som mener at for opprettholdelse av god kvalitetskontroll av diagnostisering bør den landsdekkende raten ligge på minst 25%, mens de store sykehusene bør ha en rate på over 40-50%. (68),(69) I så måte har Rikshospitalet vært eksemplarisk og ligget godt an. Men selv om obduksjonsraten ved Rikshospitalet har holdt seg på et høyt nivå, har den vært den fallende også her - med ca 10 % årlig de siste tre årene fra 78 % i 2008 til 54 % i 2010. Fallet i obduksjonsfrekvens ble tydelig etter den nye loven om sykehusobduksjoner (se nedenfor). I tillegg må jeg ta høyde for at mitt utvalg kan være beheftet med ulike skjevheter. Gangen fra dødsfall til gjennomført obduksjon går gjennom flere ledd. For det første må behandlende pasientansvarlig lege begjære en autopsi. Ett av motivene for en slik begjæring er nettopp uklarhet rundt dødsårsaken. Slik kan man forvente en høyere forekomst av ikke erkjente diagnoser i dette utvalget. For det andre må det også regnes med at de aktuelle legers holdninger og meninger om nytteverdien av slike post mortem undersøkelser påvirker utfallet av hvor ofte og av hvilke pasienter det begjæres obduksjon av. Dermed er slike subjektive vurderinger med på å forme utvalget også i denne oppgaven. For det tredje må det etter den nye obduksjonsforskriften av 1.4. 2004 innhentes informert samtykke fra pårørende for å kunne foreta ikkerettslige obduksjoner. Dette er enda et

ledd der variable som personlige, etiske og religiøse synspunkter kan ha påvirket sammensetningen av utvalget i denne oppgaven.

3.6. *Diagnostisering*

Med forbehold om statistisk lite grunnlag -10 pasienter i post mortem gruppen - er det urovekkende at kun 4 (hvorav én kun to dager ante mortem) hadde diagnostisert eller mistenkt muggsoppinfeksjon. I tillegg viser journalene at 3 av disse 10 med reell infeksjon ikke hadde fått adekvat muggsoppbehandling, hverken på grunnlag av mistanke eller profylaktisk (se tabell 3.13). Dagens standardmiddel ved OUS-Rikshospitalet når det gjelder sopprofylakse ved for eksempel hematologisk stamcelletransplantasjon er Flukonazol. Dette midlet har ingen virkning mot muggsopp.

Den premortale diagnostiseringen av muggsoppinfeksjoner er vanskelig. Dette bekreftes av at det var hele 6 av 10 pasienter i mitt utvalg der det ikke forelå mistanke om muggsoppinfeksjon, og 3 av disse heller ikke hadde fått profylaktisk adekvat antimykotika. På bakgrunn av sannsynlig underrapportering, er det dog vanskelig å si noe om hvor mange pasienter faktisk blir diagnostisert eller får mistenkt en slik invasiv mykose for deretter å bli vellykket behandlet.

Et annet aspekt ved diagnostiseringen av aspergillose, særlig ante mortem, dvs i klinisk praksis, er implementeringen av nyere teknikker som nukleinsyreamplifiseringstesten og målingen av serummarkører. Disse er blitt etter hvert velutprøvd, godt standardiserte, er med i konsensuskriteriene til EORTC/MSG og anbefales i flere kliniske retningslinjer, som BestPractice (26) og UpToDate (41). Gensekvenseringen for 18 rDNA på direkte prøvemateriale har vært brukt i økende omfang de siste årene og ved Mikrobiologisk avdeling på Rikshospitalet. Men deteksjon av soprantigenet β -(1,3)-D-glukan og muggsoppspesifikke galaktomannan i serum eller materiale fra sterile kroppsrom har ikke blitt tatt i bruk per dags dato ved OUS.

Referanser

1. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):471-4.
2. Staab JF, Wong B. Fungal Infections, Systemic. In: Moselio S, editor. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 389-411.
3. Dorr P. Fungi and Fungal Disease. In: John BT, David JT, editors. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier; 2007. p. 419-43.
4. Lehrnbecher T, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*. 2010 Sep;61(3):259-65.
5. Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Human Pathology*. 1982;13(6):519-33.
6. Sherif R, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 May;16(3):242-50.
7. Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2009 Oct;11(12):919-27.
8. Fjetland A. Invasiv aspergillose. [prosjektoppgave ved medisinsk fakultet, UiO]. 2010.
9. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jul;22(3):447-65.
10. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. 2004 Nov;80(5):1106-22.
11. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001 December 1, 2001;33(11):1824-33.
12. Warris A. Invasive filamentous fungal infections. *Epidemiology and host responses*. 2005.
13. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2003;38(2):143-58.
14. Chai LY, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WW, Warris A, et al. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*. 2010 Nov;215(11):915-20.
15. Hakanpää J, Paananen A, Askolin S, Nakari-Setälä T, Parkkinen T, Penttilä M, et al. Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 January 2, 2004;279(1):534-9.
16. Aimaniananda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. [10.1038/nature09134]. 2010;465(7300):966-.
17. Kogan TV, Jadoun J, Mittelman L, Hirschberg K, Osherov N. Involvement of Secreted *Aspergillus fumigatus* Proteases in Disruption of the Actin Fiber Cytoskeleton and Loss of Focal Adhesion Sites in Infected A549 Lung Pneumocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 2004 June 1, 2004;189(11):1965-73.
18. Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, Grillot R, Robson G, Brugere JF. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Oct 1;239(1):87-93.

19. Khoufache K, Puel O, Loiseau N, Delaforge M, Rivollet D, Coste A, et al. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2007;7:5.
20. Daly P, Kavanagh K. Immobilization of *Aspergillus fumigatus* colonies in a soft agar matrix allows visualization of A549 cell detachment and death. *Med Mycol.* 2002 Feb;40(1):27-33.
21. Daly P, Verhaegen S, Clynes M, Kavanagh K. Culture filtrates of *Aspergillus fumigatus* induce different modes of cell death in human cancer cell lines. *Mycopathologia.* 1999;146(2):67-74.
22. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):635-7.
23. Schaffner A, Douglas H, Braude AI, Davis CE. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun.* 1983 Dec;42(3):1109-15.
24. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003 Nov 29;362(9398):1828-38.
25. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews.* 2007;219(1):88-102.
26. Aspergillosis. BMJ Publishing Group Limited; 2011 [cited 2011 29 February]; Available from: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/425/treatment.html>.
27. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2008 Oct 23;359(17):1766-77.
28. Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jul;15(7):625-33.
29. Zaas AK, Liao G, Chien JW, Weinberg C, Shore D, Giles SS, et al. Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis. *PLoS Genet.* 2008 Jun;4(6):e1000101.
30. Nordøy I, Gaustad P. Resistensproblemer ved behandling av invasive soppinfeksjoner. *Tidsskr Nor Legeforen.* 2008;128(22):2607-11.
31. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005 Oct;5(10):609-22.
32. Segal BH, DeCarlo ES, Kwon-Chung KJ, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore).* 1998 Sep;77(5):345-54.
33. EAPCRI Working Group. EAPCRI: European *Aspergillus* PCR Initiative. International society for human and animal mycology; 2011 [cited 2011 28 February]; Available from: <http://www.eapcri.eu/>.
34. Thornton CR. Detection of invasive aspergillosis. *Adv Appl Microbiol.* 2010;70:187-216.
35. Koo S, Bryar JM, Baden LR, Marty FM. Prognostic features of galactomannan antigenemia in galactomannan-positive invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1255-60.
36. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2006 May;44(5):1711-8.

37. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jun;4(6):349-57.
38. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006 May 15;42(10):1417-27.
39. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(4):CD007394.
40. Maertens JA, Klont R, Masson C, Theunissen K, Meersseman W, Lagrou K, et al. Optimization of the cutoff value for the *Aspergillus* double-sandwich enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis.* 2007 May 15;44(10):1329-36.
41. Sugar AM. Clinical features and diagnosis of invasive aspergillosis. 2011 UpToDate, Inc.; 2010 [updated 10 June 2010; cited 2011 28 February]; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-invasive-aspergillosis?source=preview&selectedTitle=1~150&anchor=H1#H1>.
42. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008 Jun 15;46(12):1813-21.
43. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 15;39(2):199-205.
44. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-{beta}-D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol.* 2005 December 1, 2005;43(12):5957-62.
45. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):299-305.
46. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jul;15(7):1095-105.
47. Marot-Leblond A, Grimaud L, David S, Sullivan DJ, Coleman DC, Ponton J, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):4956-60.
48. Chambers ST, Bhandari S, Scott-Thomas A, Syhre M. Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2010 Aug 26.
49. Weig M, Frosch M, Tintelnot K, Haas A, Gro U, Linsmeier B, et al. Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-Associated Diseases. *J Clin Microbiol.* 2001 May 1, 2001;39(5):1721-30.
50. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis.* 2003 Oct 1;37 Suppl 3:S265-80.
51. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly PJ. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2009;9(2):89-96.

52. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol.* 2007 Jun;24(2):89-94.
53. Cuenca-Estrella M, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, et al. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):379-84.
54. Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, Luna M, Han XY, May GS, et al. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol.* 2003 Jun;119(6):854-8.
55. Einsele H, Quabeck K, Muller KD, Hebart H, Rothenhofer I, Loffler J, et al. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonisation of lower respiratory tract before marrow transplantation. *Lancet.* 1998 Oct 31;352(9138):1443.
56. Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet.* 2000 Feb 5;355(9202):423-4.
57. Bennett JE. Hold the Mould: Diagnosing and Treating Aspergillosis in New Ways. *Medscape*; 2002 [cited 2011 28 February]; Available from: http://www.medscape.org/viewarticle/444470_4.
58. Neofytos D. Chest computed tomography versus serum galactomannan enzyme immunoassay for the diagnosis of probable invasive aspergillosis: to be decided. *Clin Infect Dis.* 2010 Dec 1;51(11):1281-3.
59. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlendorf M, van de Loo J. Pulmonary Aspergillosis: Early Diagnosis Improves Survival. *Respiration.* 1995;62(6):341-7.
60. Simonsen GS. Norsk legemiddelhåndbok. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok; 2010 [cited 2011 20.03.2012]; Available from: www.legemiddelhandboka.no.
61. Hageskal G, Gaustad P, Heier BT, Skaar I. Occurrence of moulds in drinking water. *Journal of Applied Microbiology.* 2007;102(3):774-80.
62. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 2008 Nov 11;5(11):e219.
63. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect.* 2006 Jul;63(3):246-54.
64. Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol.* 1998 Jun;36(3):165-8.
65. Skarvøy L. Sykehus droppet sikkerhetstiltak - kreftpasienter fikk livsfarlig soppinfeksjon. *VG Nett.* 2011 27 January.
66. Anaissie EJ, Costa SF. Nosocomial Aspergillosis Is Waterborne. *Clinical Infectious Diseases.* 2001 November 1, 2001;33(9):1546-8.
67. Robenshtok E, Gafter-Gvili A, Goldberg E, Weinberger M, Yeshurun M, Leibovici L, et al. Antifungal Prophylaxis in Cancer Patients After Chemotherapy or Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology.* 2007 December 1, 2007;25(34):5471-89.
68. Sundar T. Sykehusobduksjon - sterk tradisjon under press. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2003 09.10.2003;123:2746-9.
69. Berget ER, M.; Svendsen, E.B.; Bertelsen, B.I.; Mæhle, B.O.; Svendsen, E. Obduksjon - kvalitetssikring i siste ledd. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2007 01.11.2007(127):2800-2.

